

Función del gen *dRYBP* durante el desarrollo de *Drosophila* y su regulación por microRNAs

Memoria presentada por Ricardo Aparicio Crespo para optar al grado de Doctor en
Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid
16 de Mayo de 2012

Directora de Tesis: Ana de Busturia Jimeno
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”

Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Resumen en inglés	1
Introducción	2
1. Procesos biológicos	3
1.1. Morfogénesis y control del tamaño de los órganos	3
1.2. Sistema hematopoyético	7
1.3. Respuesta inmune	8
2. Mecanismos de regulación de la expresión génica	12
2.1. Ruta de Imd	12
2.2. Regulación epigenética de la expresión génica mediada por proteínas Polycomb y trithorax	15
2.3. Regulación de la expresión génica mediada por microRNAs	18
Objetivos	20
Materiales y Métodos	21
1. Cepas de moscas utilizadas	21
2. Obtención de moscas transgénicas	22
3. Expresión ectópicas	22
4. Cepas bacterianas utilizadas para la infección de moscas	22
5. Infección de moscas	22
6. Análisis de la supervivencia	23
7. Tinción histoquímica con X-Gal	23
8. Inmunohistoquímica	23
8.1. Fijación de embriones	24
8.2. Fijación de discos imaginales, de intestino y cuerpo graso	24
8.3. Fijación de tumores melanóticos	24
8.4. Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia	24
8.5. Inmunohistoquímica para microscopía visible	25
9. Western blot	26
10. Citometría de flujo	26
11. Hibridación <i>in situ</i>	27
12. Estimación del número de “Crystal cells”	28
13. Preparación de cutículas adultas y larvarias para su observación microscópica	28
14. PCR cuantitativa	28

15. Análisis estadístico	29
16. Aislamiento de ADN genómico	29
17. Construcción de los minigenes UAS miR-284, UAS miR-304, UAS miR-306, sensor dRYBP y sensor dRYBP miR-7 mut	30
Resultados	32
1. Función de la proteína dRYBP en el mantenimiento de la expresión génica	32
2. Estudio de la viabilidad a lo largo del desarrollo de mutantes en el gen <i>dRYBP</i> y sus fenotipos en la larva y en el individuo adulto	35
3. Búsqueda de genes que interaccionan con el gen <i>dRYBP</i>	37
4. Función del gen <i>dRYBP</i> y de las proteínas PcG en la hematopoyesis	40
5. Función del gen <i>dRYBP</i> en la respuesta inmune	45
5.1. El gen <i>dRYBP</i> se expresa en los tejidos inmuno-competentes de la mosca	45
5.2. EL gen <i>dRYBP</i> no regula la respuesta inmune controlada por la ruta de Toll	45
5.3. El gen <i>dRYBP</i> regula la respuesta inmune controlada por la ruta de Imd	46
5.4. Altos niveles de la proteína dRYBP inhiben la respuesta inmune	48
5.5. Los niveles de expresión de la proteína dRYBP influyen en la supervivencia de moscas infectadas con bacterias Gram-negativas	49
5.6. Estudio en los mecanismos de regulación de la actividad de la vía de Imd mediada por dRYBP	51
5.7. Análisis epistático de la función de dRYBP en la ruta de Imd	53
5.8. Localización celular de la proteína dRYBP en condiciones de infección	56
6. Regulación de la expresión de <i>dRYBP</i> mediada por microRNAs	57
6.1. Análisis de los 3'UTRs del gen <i>dRYBP</i> en sus homólogos en ratón y humano	58
6.2. Efectos fenotípicos de la sobre-expresión de los microRNAs: miR-7, miR-284, miR-304, miR-306 y miR-iab-4-5p	60
6.3. Regulación de la expresión de <i>dRYBP</i> mediada por el <i>miR-7</i>	62
6.3.1. Expresión del <i>miR-7</i> durante el desarrollo de <i>Drosophila</i>	62
6.3.2. <i>miR-7</i> regula la expresión de <i>dRYBP</i>	64
6.3.3. ¿Regula <i>miR-7</i> los niveles de expresión de <i>dRYBP</i> mediante la interacción con su 3'UTR?	65
6.3.4. Fenotipos de falta de función del <i>microRNA-7</i>	65
6.3.5. Función de <i>miR-7</i> en el desarrollo del ala	68
Discusión	72
1. Función del gen <i>dRYBP</i> en la regulación epigenética de la expresión génica	72
2. Función del en <i>dRYBP</i> y de los genes <i>PcG</i> en el sistema hematopoyético de	

<i>Drosophila</i>	74
3. Función de <i>dRYBP</i> en la respuesta inmune de <i>Drosophila</i>	77
4. Regulación de la expresión de <i>dRYBP</i> mediada por microRNAs	80
Conclusiones	85
Bibliografía	86
Anexos	98

RESUMEN DEL TRABAJO EN INGLÉS

Summary

Controlled spatial and temporal regulation of gene expression is required for animal development and survival. Once gene transcriptional states have been established, their maintenance during cellular proliferation is crucial for the organism. The Polycomb (*PcG*) and the trithorax (*trxG*) groups of genes play a pivotal role in this process. The *PcG* and *trxG* genes were first identified in *Drosophila melanogaster*, due to their role in morphogenesis as regulators of homeotic gene expression. However, studies in vertebrates, as well as emerging studies in *Drosophila* support the idea that the *PcG* and *trxG* genes also have significant roles in other biological processes, such as hematopoiesis, stem cell renewal, control of cell proliferation and tumorigenesis. In this Thesis, it has been studied the function of dRYBP (*Drosophila* Ring and YY1 Binding Protein), a *PcG* and *trxG* associated protein, in the development of *Drosophila*.

The conclusions of this Thesis work are the following: 1) The dRYBP protein regulates gene expression through its interaction with the Polycomb Response Elements of the target genes. 2) The *polyhomeotic* (*ph*) and the *pleiohomeotic* (*pho*) genes, both of the *PcG*, participate in the hematopoiesis of *Drosophila* regulating the proliferation and/or the differentiation of the “Crystal cells”. Low levels of PHO produce a decrease in the number of Crystal cells”, while both low and high levels of PH produce an increase in the number of “Crystal cells”. 3) The *dRYBP* gene participates in the hematopoiesis of *Drosophila* regulating the total number of hemocytes controlling their apoptosis/proliferation. 4) The *dRYBP* gene, which is expressed in the immune-competent tissues, regulates the immune response of *Drosophila*. Under immune challenge, the dRYBP gene negatively regulates the immune response controlled by the Imd pathway. 5) The dRYBP protein does not transcriptionally control the expression of the Imd pathway components. 6) The dRYBP protein functions together with SKPA to inhibit the immune response. The repression can take place at different levels of the Imd pathway: at the Imd level and at the Relish level. 7) High levels of expression of *miR-7*, *miR-284* y *miR-306* induce a decrease in the wing size. 8) The levels of expression of dRYBP are regulated by *miR-7*, which is expressed in the boundary cells of the wing imaginal disc. 9) High levels of dRYBP repress the Notch signalling pathway in the non boundary cells of the wing imaginal disc, and 10) *miR-7* controls Notch signalling pathway at the dorso-ventral boundary to regulate the size of the wing imaginal disc.

INTRODUCCIÓN

La Biología del Desarrollo estudia los procesos y los mecanismos que permiten el desarrollo de un individuo adulto a partir de una única célula, el óvulo fertilizado. La mosca *Drosophila melanogaster* ha tenido, y tiene, una gran importancia como sistema modelo en el estudio del desarrollo de los organismos, ya que, presenta un gran número de ventajas frente a otros organismos modelo, como son: ciclo vital de 10 días, fácil manejo, elevada fertilidad, relativamente bajo número de cromosomas, gran número de técnicas genéticas y moleculares, y muy importante la conservación de su genoma, y de los mecanismos que controlan los procesos biológicos del desarrollo entre la mosca y el reino animal (Ashburner, 1989).

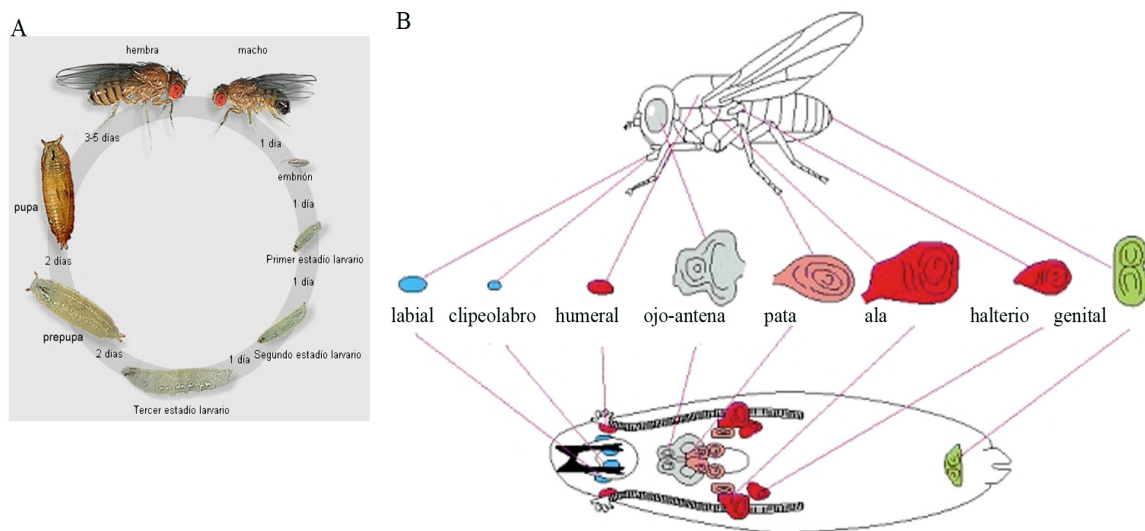


Figura 1: Desarrollo de *Drosophila melanogaster*: (A) Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*, (tomado de Fly-Move). (B) Representación esquemática de los discos imaginales de *Drosophila*, su posición en la larva y la estructura adulta a la que darán lugar después de la metamorfosis. Modificado de (Alberts y cols., 2002).

Drosophila melanogaster tiene un ciclo vital de aproximadamente diez días a 25°C en los que pasa por distintas fases (Figura 1A). La primera fase del desarrollo ocurre en la etapa embrionaria, que dura aproximadamente 24 horas. Transcurrido este tiempo el embrión eclosiona y da lugar a la siguiente fase del desarrollo, la etapa larvaria. En esta etapa del desarrollo permanece durante 4 días en los cuales tiene lugar la proliferación de los discos imaginales (Figura 1B), que darán lugar a las estructuras correspondientes en el individuo adulto. Además de estas estructuras, durante el desarrollo de la larva, también se produce el desarrollo de estructuras larvarias como la glándula linfática, que producirá los hemocitos presentes en el individuo adulto. Los

últimos cinco días del desarrollo de *Drosophila* tienen lugar durante la fase pupal en la cual tiene lugar la proliferación de los histoblastos que darán lugar al abdomen, y la metamorfosis de los discos imaginales, que producirán las estructuras adultas. Al final de estos 10 días el individuo adulto emerge de la pupa (Figura 1A) (Ashburner, 1989).

El uso de *Drosophila* como sistema modelo está ayudando a resolver y descubrir muchas cuestiones importantes en la Biología del Desarrollo como son la descripción y el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de morfogénesis, de respuesta inmune y hematopoyéticos. En lo que sigue se describirán en el primer apartado los procesos biológicos que han sido estudiados en esta Tesis y, a continuación, en el segundo apartado se describirán los mecanismos de regulación de la expresión génica que tienen lugar durante estos procesos biológicos.

1 Procesos biológicos

1.1 Morfogénesis y control del tamaño de los órganos

Durante el proceso de morfogénesis se genera el patrón morfológico de la mosca en el que se tiene que generar un individuo con un determinado número de órganos como 6 patas, 2 alas, etc. Durante este proceso también tiene lugar la proliferación de las distintas estructuras para que éstas alcancen su tamaño final. La regulación del tamaño de los órganos se lleva a cabo mediante la activación y la represión de los mecanismos de proliferación que hacen que los órganos alcancen sus dimensiones apropiadas y que paren de proliferar cuando estas dimensiones han sido alcanzadas. Fallos en los procesos de regulación de la proliferación conllevan a malformaciones del patrón morfogenético.

El cuerpo de *Drosophila*, como el de otros muchos organismos está dividido en segmentos (Figura 2). El proceso de segmentación comienza muy temprano en el desarrollo y está mediado por la expresión de una serie de genes, muchos de ellos factores de transcripción, que actúan secuencialmente durante el desarrollo del embrión. Inicialmente se establece el eje antero/posterior embrionario, que se define por la acción de los genes maternos que regulan la expresión de los genes “gap”, que a su vez controlan la expresión de los genes “pair rule” (Figura 2) (Lawrence, 1992). Los genes “pair rule” se expresan en siete bandas complementarias (Lawrence, 1992). La actividad combinatoria de estos genes determina los valores de información posicional a lo largo del eje antero/posterior en el que se basa el patrón definitivo de catorce parasegmentos embrionarios (Figura 2). Una vez establecido el número de parasegmentos, los

genes de “polaridad segmental”, especifican los compartimentos dentro de cada parasegmento. Tanto los genes “pair rule” como los genes de “polaridad segmental” establecen los límites de expresión de los genes homeóticos, que otorgan identidad a cada uno de los segmentos (Lawrence, 1992). El establecimiento del patrón de segmentación que ha sucedido durante el desarrollo embrionario se mantiene a lo largo del desarrollo larvario y pupal (Lawrence, 1992).

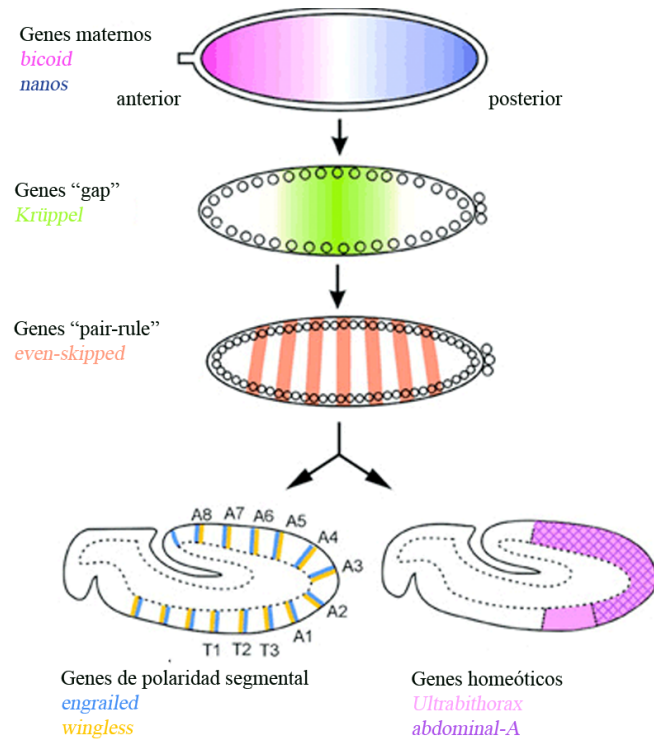


Figura 2: Cascada genética implicada en la segmentación del embrión de *Drosophila*. Las proteínas maternas activan la expresión diferencial de los genes zigóticos “gap”, que a su vez activan la expresión de los genes “pair-rule”, que activan la expresión de los genes de polaridad segmental y, finalmente y coordinadamente a los genes homeóticos. Modificado de (Sanson, 2001).

La proliferación celular comienza en la fase embrionaria, donde tienen lugar de cuatro a seis divisiones celulares para obtener un embrión adecuado en forma y tamaño (Ashburner, 1989). Sin embargo, durante la fase larvaria, donde tiene lugar la proliferación de las estructuras imaginales que darán lugar a las estructuras adultas, la proliferación es mucho más significativa, por ejemplo, en el disco imaginal de ala tienen lugar unas 15 divisiones celulares (García-Bellido and Merriam, 1971). Es en esta fase larvaria donde *Drosophila* se ofrece como un excelente modelo para el estudio del control del tamaño, como el de la glándula linfática y los discos imaginales.

El disco imaginal de ala es el primordio que dará lugar al notum y al ala propiamente dicha de la mosca. El ala del individuo adulto presenta un tamaño y una morfología específica. Esta estructura adulta se genera a partir de un grupo de entre 30 y 40 células para alcanzar un tamaño final de aproximadamente 5×10^4 células (revisado en (Herranz and Milan, 2008)). La proliferación de este grupo de células está regulada por la expresión de una serie de morfógenos y factores de transcripción que regulan el ciclo celular (Figura 3) (revisado en (Strigini and Cohen, 1999; Cadigan, 2002)). Por un lado, la formación del borde antero/posterior está dirigida por la expresión del gen *engrai-*

led en el compartimento posterior del disco imaginal (Brower, 1986; Hidalgo, 1994). Esta expresión diferencial del gen *engrailed* produce la activación del morfógeno Decapentaplegic (Dpp) en el borde antero/posterior (Figura 3A) (Hidalgo, 1994; Sanicola et al., 1995). Esta proteína difunde a lo largo del borde induciendo la activación de una serie de genes en las células adyacentes, lo que produce la proliferación celular de las células cercanas al borde (Posakony et al., 1990). Por otro lado, la expresión del factor de transcripción Apterous (Ap) define el compartimento dorsal del disco imaginal de ala (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993; Blair et al., 1994). La confrontación entre células dorsales y ventrales produce la activación de la ruta de señalización de Notch en el borde dorso/ventral (Figura 3B) (de Celis et al., 1996). Esta ruta de señalización activa distintas proteínas entre las que se encuentra el morfógeno Wingless (Wg) (Figura 3C) (Neumann and Cohen, 1996), que difunde a lo largo del borde dorso/ventral induciendo la proliferación de las células adyacentes al mismo (Zecca et al., 1996; Neumann and Cohen, 1997).

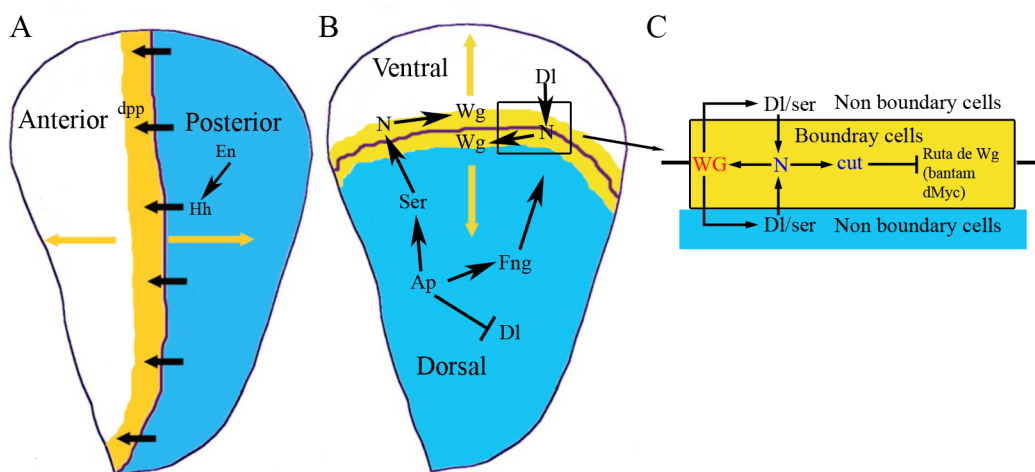


Figura 3: Desarrollo del disco imaginal de ala. (A) Formación del borde antero/posterior mediado por las proteínas Engrailed y Hedgehog, dando lugar a la formación del borde antero/posterior donde se expresa el morfógeno DPP. (B) Formación del borde dorso/ventral mediado por la ruta de señalización de Notch y Wingless. La expresión restringida de la proteína Apterous en las células dorsales subdivide el ala en el compartimento dorsal y ventral. Las interacciones entre células dorsales y ventrales resultan en la activación de Notch a lo largo del borde dorso/Ventral. Apterous induce la expresión de Serrate, el ligando de Notch, en células dorsales y restringe la expresión de Delta, otro ligando de Notch a las células ventrales. Las células dorsales expresando Delta y las células ventrales expresando Serrate activan Notch en el borde dorso/ventral, que induce la expresión de Wingless y la expresión de Cut en estas células (C) Ruta de señalización en el borde dorso/ventral. La expresión de la proteína Notch en las "boundary cells" viene determinada por Delta y Serrate, la activación de esta da lugar a la activación del morfógeno Wingless y el factor de transcripción Cut. El morfógeno Wingless difunde a lo largo del borde dorso/ventral, dando lugar a la formación de la zona denominada "non boundary cells".

Una vez el disco imaginal de ala ha alcanzado su tamaño final, las células que forman parte del mismo tienen que parar de proliferar. En este punto la formación del borde dorso/ventral juega un papel importante, ya que la activación de la ruta de señalización de Notch induce la activación del factor de transcripción Cut, que inhibe la

proliferación celular al inhibir la expresión de los genes *dMyc* y *bantam*, responsables del crecimiento del disco imaginal de ala (Figura 3C) (Micchelli et al., 1997). La parada del ciclo celular en el borde dorso/ventral es uno de los puntos de regulación del crecimiento del disco imaginal de ala (Herranz and Milan, 2008).

En esta Tesis, también se ha estudiado el desarrollo de la glándula linfática durante el desarrollo larvario (Figura 4). La glándula linfática es el órgano en el cual se produce la proliferación y la diferenciación de los hemocitos, que estarán presentes en el individuo adulto. Este órgano es eliminado durante la metamorfosis, por lo que todos los hemocitos presentes en el individuo adulto proceden de la glándula linfática y del embrión (Tepass et al., 1994; Holz et al., 2003). El primordio de la glándula linfática se encuentra localizado en el cavidad dorsal entre el tercer segmento torácico (t3) y el primer segmento abdominal (a1) del embrión (Krzemien et al., 2010). El desarrollo de la glándula linfática comienza durante la etapa 11 del desarrollo embrionario y viene determi-

nada por la especificación de un grupo de células que expresan una serie de factores de transcripción, entre los que se encuentran Antennapedia, Serpent y Collier (Lebestky et al., 2000; Crozatier et al., 2004; Mandal et al., 2007), que dan lugar a la formación de los distintos lóbulos que forman parte de la misma (Figura 4) (Krzemien et al., 2010). La glándula linfática está formada por dos lóbulos, el lóbulo primario y el lóbulo secundario, siendo el lóbulo primario el más relevante en la proliferación de los hemocitos (Figura 4) (Jung et al., 2005). Este lóbulo está constituido por la zona medular, la zona cortical y el “Posterior Signalling Center” (PSC) (Figura 4) (Jung et al., 2005). En la zona medular se encuentran los pro-hemocitos, así denominados por que no expresan ningún marcador de diferenciación (Jung et al., 2005). Estos pro-hemocitos o bien,

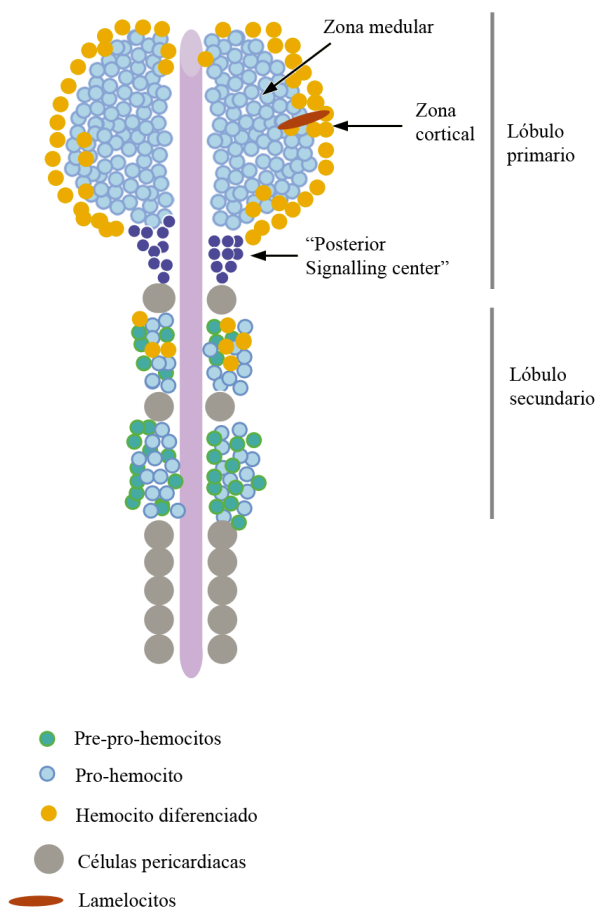


Figura 4: Representación esquemática de la glándula linfática de *Drosophila*. Ver texto para explicación. Modificado de (Jung et al., 2005).

prolifera para mantener un reservorio de pro-hemocitos que diferenciarán durante una infección o durante la metamorfosis, o bien expresan marcadores de diferenciación dando lugar a hemocitos diferenciados, que se encuentran localizados en la zona cortical del lóbulo primario de la glándula linfática (Figura 4) (Williams, 2007). La tercera zona del lóbulo primario de la glándula linfática, el PSC, está definido por la expresión del gen homeótico *Antenapedia* y *Serrate* (Figura 4) (Lebestky et al., 2003), ligando del receptor Notch, siendo el papel de esta zona la diferenciación de los pro-hemocitos a “Crystal cells” y a lamelocitos, dos clases de hemocitos diferenciados (Crozatier et al., 2004; Mandal et al., 2007), que se describirán en los capítulos 1.2 y 1.3. El segundo lóbulo que forma la glándula linfática no presenta diferentes zonas celulares y actúa como reservorio de hemocitos sin diferenciar, los pro-hemocitos (Figura 4) (Jung et al., 2005). Así pues, el desarrollo de la glándula linfática y en particular del lóbulo primario depende de la proliferación y diferenciación de los pro-hemocitos.

1.2 Sistema hematopoyético en *Drosophila*

La hematopoyesis en *Drosophila* consiste en la diferenciación de tres tipos celulares: plasmátocitos, “Crystal cells” y lamelocitos a partir de un progenitor común denominado pro-hemocito (Figura 5) (Revisado en (Crozatier and Meister, 2007)). En *Drosophila* existen dos ondas de diferenciación de los hemocitos, una durante la etapa embrionaria, que dará lugar a los hemocitos presentes en la larva y en el individuo adulto y otra durante la etapa larvaria, que dará lugar a los hemocitos que estarán presentes durante la vida del individuo adulto (Tepass et al., 1994; Holz et al., 2003; Krzemien et al., 2010). Cada tipo de hemocito presenta unas características y funciones específicas tanto en el desarrollo del individuo adulto como durante los procesos de respuesta inmune, que tienen lugar durante la infección (Figura 6) (revisado en (Crozatier and Meister, 2007)).

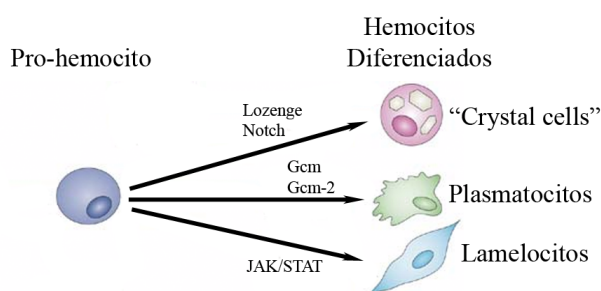


Figura 5: Diferenciación de los distintos tipos de hemocitos de *Drosophila*. La diferenciación desde pro-hemocitos a “Crystal cells” viene determinada por la actividad de Notch y Lozenge. La diferenciación a plasmátocitos implica a los factores de transcripción GCM (Glial Cells Missing) y GCM-2 (Glial Cells Missing-2). La diferenciación a lamelocitos viene determinada por la activación de la ruta de JAK/STAT. Modificada de (Wood and Jacinto, 2007).

Los plasmátocitos, que representan alrededor del 95% de los hemocitos circulantes en la hemolinfa de la larva, se diferencian cuando los pro-hemocitos expresan dos

factores de transcripción, Glial Cell Missing (GCM) y Glial Cell Missing-2 (GCM-2) (Figura 5) (Lebestky et al., 2000). Los plasmotocitos tienen distintas funciones en el desarrollo y en la respuesta inmune celular (Figura 6) (Revisado en (Crozatier and Meister, 2007)). Por ejemplo, se encargan de la deposición de proteínas de la matriz extracelular durante el desarrollo embrionario permitiendo la condensación del sistema nervioso central (Olofsson and Page, 2005). Por otro lado, los plasmotocitos también se encargan del reconocimiento y fagocitosis tanto de patógenos como de células apoptóticas, mediante la acción de la proteína de membrana Croquemort (Crq), que reconoce células apoptóticas (Franc et al., 1999; Ramet et al., 2002).

Las “Crystal cells” representan entre el 4 y el 5% de los hemocitos presentes en la hemolinfa de la larva (Crozatier and Meister, 2007). La diferenciación de las “Crystal cells” esta mediada por la expresión del factor de transcripción Lozenge (Lz) (Lebestky et al., 2000), y la activación de la vía de Notch (Figura 5) (Lebestky et al., 2000). Las “Crystal cells” intervienen principalmente en los procesos de melanización, cicatrización y coagulación, que tienen lugar durante la reparación del epitelio o la infección (Figura 6) (revisado en (Crozatier and Meister, 2007)).

Por último, los lamelocitos raramente se encuentran en la hemolinfa, y su función es encapsular y fagocitar sustancias extrañas al organismo demasiado grandes para ser fagocitadas por los plasmotocitos (Figura 6) (Rizki and Rizki, 1984; Lanot et al., 2001; Crozatier and Meister, 2007). La diferenciación de los lamelocitos viene determinada por la activación de distintas rutas de señalización, entre las que se encuentra la ruta de JAK/STAT (Figura 5) (Sorrentino et al., 2004; Huang et al., 2005). Debido a su papel durante los procesos infecciosos que tienen lugar en la mosca, los lamelocitos no diferencian durante la etapa embrionaria, sino que diferencian única y exclusivamente en el momento en el que se produce una infección (revisado en (Lemaitre and Hoffmann, 2007)).

1.3 Respuesta inmune

Todos los organismos multicelulares están dotados de un sistema de respuesta inmune para hacer frente a los posibles ataques de microorganismos a los que están continuamente expuestos. *Drosophila* al contrario que los vertebrados, sólo contiene respuesta inmune innata y responde a la infección producida por los patógenos de dos formas distintas, la respuesta humoral y la respuesta celular (Figura 6) (revisado en (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Williams, 2007)). La respuesta inmune humo-

ral consiste en la activación de una serie de genes de respuesta inmune, entre los que se encuentran los genes que codifican para los péptidos antimicrobianos, que son los principales responsables de la eliminación de los patógenos (Figura 6) (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Ganesan et al.). Por otro lado, la respuesta inmune celular es llevada a cabo por la acción de los hemocitos que intervienen, como se ha expuesto anteriormente, en los procesos de reparación de heridas, fagocitosis y/o encapsulación (Figura 6) (Williams, 2007; Krzemien et al., 2010).

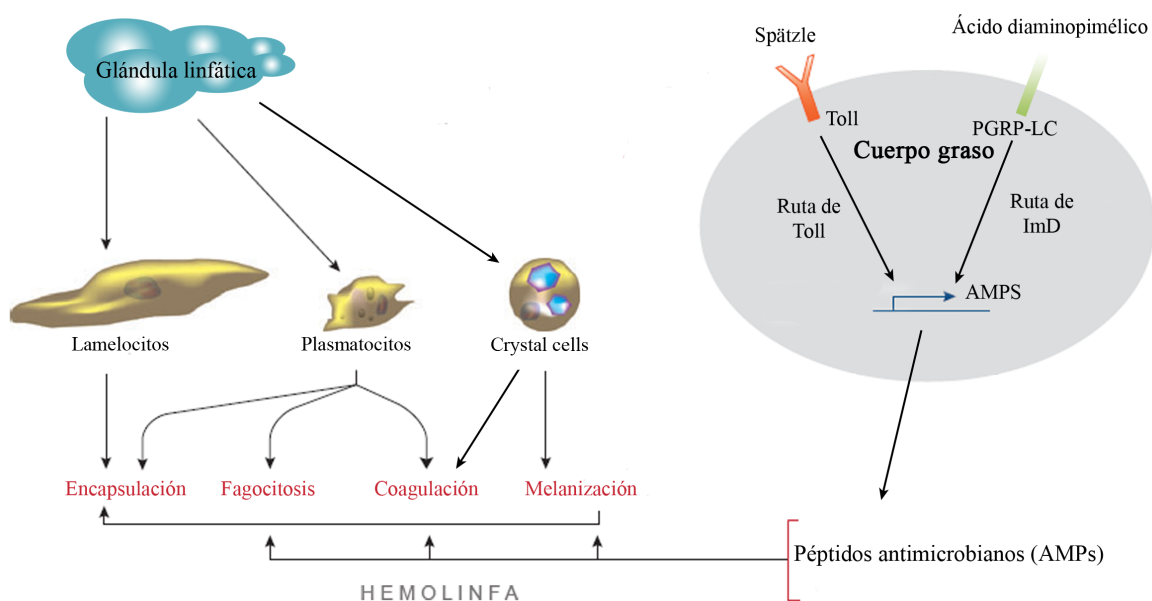


Figura 6: Representación esquemática de la respuesta inmune de *Drosophila*. La activación de la respuesta inmune en *Drosophila* induce distintos mecanismos de defensa entre los que se encuentran la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune celular. Modificado de (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Ver texto.

Al producirse una infección o herida se induce la proliferación de los distintos tipos de hemocitos presentes en la hemolinfa, que intervienen en los distintos procesos que ocurren durante la eliminación del patógeno infectante y el cierre de la herida. Uno de los primeros procesos que tiene lugar durante la reparación de una herida es la coagulación cuya función es, por un lado inmovilizar los microorganismos presentes en la misma, y por otro impedir la entrada de nuevos microorganismos (revisado en (Lemaitre and Hoffmann, 2007)). El coágulo formado está compuesto de diferentes fibras que atrapan a los hemocitos para combatir la infección, además, también se produce la proliferación de los distintos tipos de hemocitos presentes en la larva (Karlsson et al., 2004; Scherfer et al., 2004; Bidla et al., 2005). Una vez se ha producido el coágulo, ocurre la melanización y los movimientos epiteliales, que tienen lugar durante el cierre de la herida (revisado en (Lemaitre and Hoffmann, 2007)). La melanización es el re-

sultado de la deposición de melanina, la cual inhibe la actividad enzimática de algunas proteínas bacterianas y fúngicas (Ashida, 1990; Nappi and Vass, 1993; Soderhall and Cerenius, 1998). El proceso de melanización es llevado a cabo por las “Crystall cells”, que liberan a la hemolinfa la fenoloxidasas que procesa la melanina para su deposición en el lugar de la herida (Cerenius and Soderhall, 2004).

Por otro lado, cuando un organismo es reconocido como extraño este tiene que ser eliminado por fagocitosis (Tepass et al., 1994), que es el proceso por el cual se eli-

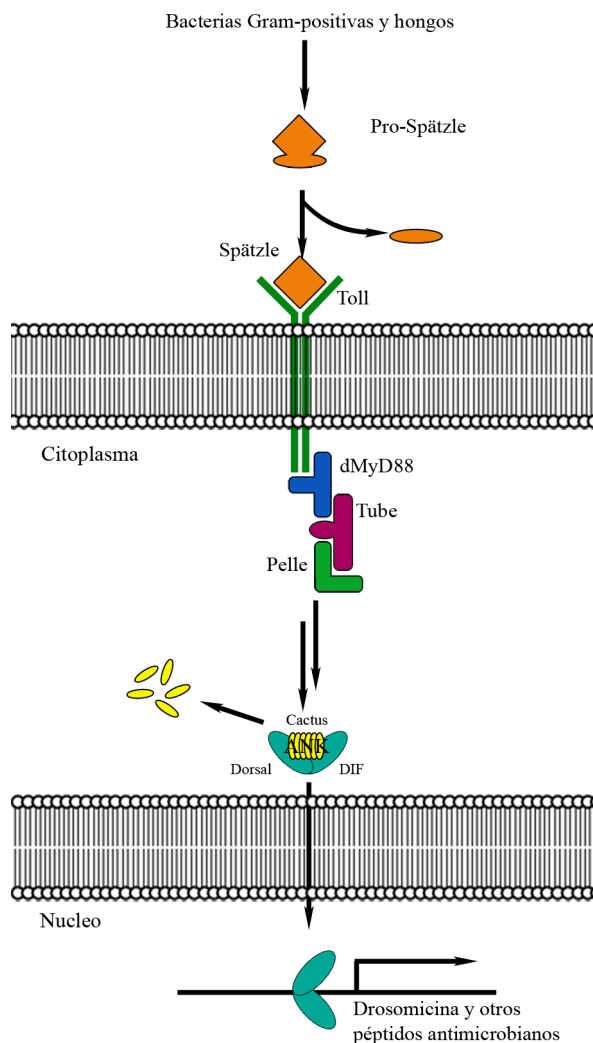


Figura 7: Esquema de la activación de la ruta de Toll. El reconocimiento de proteínas de la pared celular de bacterias Gram-positivas conlleva el procesamiento de la proteína extracelular Spätzle, que da lugar a la dimerización del receptor Toll. La activación de Toll da lugar a la activación de una cascada intracelular que conlleva la activación de las proteínas dMyD88, Tube y Pelle, que en último término llevan al procesamiento del factor de transcripción Dorsal o Dif, lo que da lugar a la producción de los péptidos antimicrobianos (AMPs), específicos de esta ruta, entre ellos la Drosomicina.

minan los patógenos y los cuerpos apoptóticos, y que en *Drosophila* está mediado por los plasmatocitos, equivalentes a los macrófagos de vertebrados (Figura 6) (Tepass et al., 1994). El reconocimiento de las células apoptóticas o células invasoras por parte de los hemocitos tiene lugar por la expresión de una serie de proteínas en la superficie celular de los plasmatocitos, entre las que se encuentra el receptor PGRP-LC (Ramet et al., 2002). Cuando un patógeno no puede ser fagocitado por los plasmatocitos, este tiene que ser eliminado por encapsulación, otro proceso que además de requerir la presencia de plasmatocitos y de “Crystal cells” implica a los lamelocitos (Figura 6) (revisado en (Meister, 2004)).

La respuesta inmune humoral de *Drosophila* tiene lugar fundamentalmente en el “fat body” o cuerpo graso, que es el equivalente funcional al hígado de los mamíferos (Sondergaard, 1993). Como se ha comentado anteriormente la respuesta inmune humoral consiste en la producción de una serie de genes de respuesta inmune, entre los que se encuen-

tran los péptidos antimicrobianos (Figura 6) (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Ganesan et al., 2011). Se han descrito dos rutas de señalización cuya activación depende del patógeno infectante (Figura 6) (revisado en (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Ganesan et al. 2011)). La infección producida por bacterias Gram-positivas u hongos activa la ruta de señalización de Toll dando lugar a la activación y traslocación al núcleo del factor de transcripción Dorsal/Dif que activa la producción, entre otros, del péptido antimicrobiano Drosomicina (Figura 7) (Lemaitre et al., 1996; Rutschmann et al., 2002). Cuando la infección es debida a bacterias Gram-negativa, se activa la ruta de Imd (Immune deficiency), que en último término, produce la activación y traslocación nuclear del factor

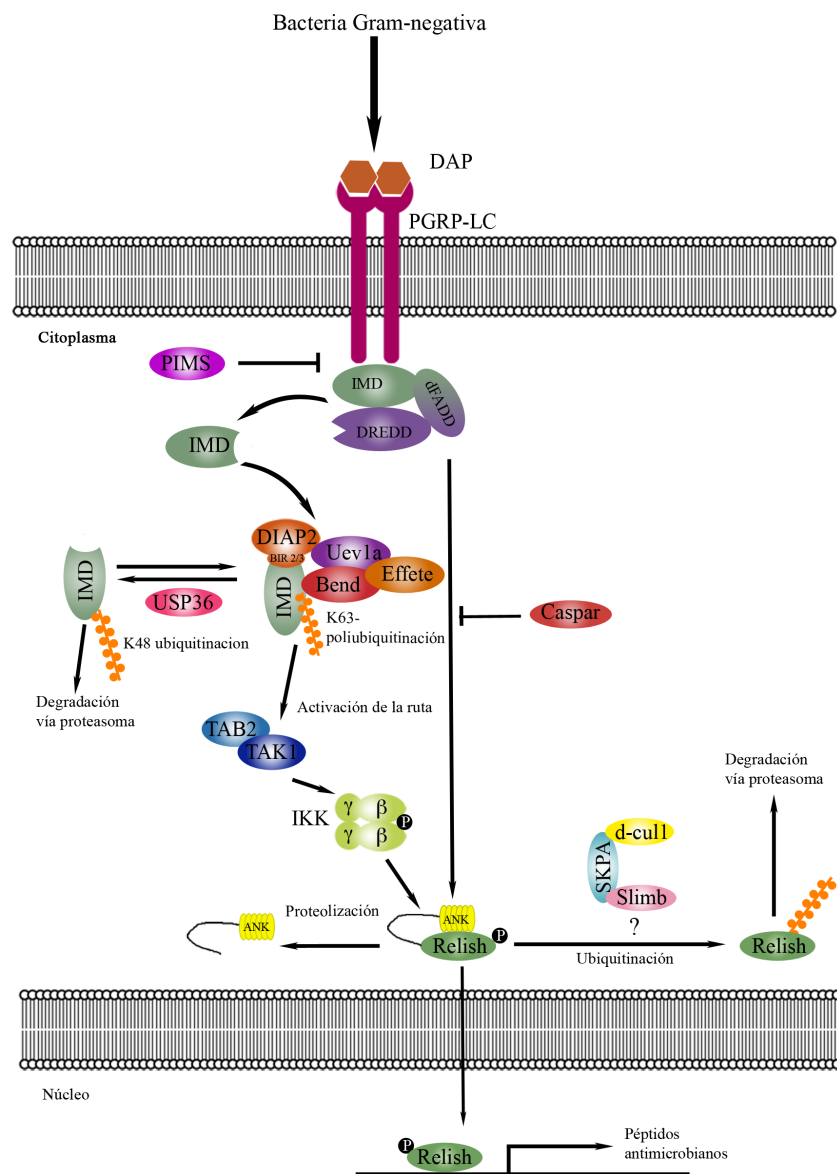


Figura 8: Esquema de la activación de la ruta de Imd. La activación del receptor PGRP-LC por el ácido diaminopimélico, presente en la pared celular de bacterias Gram-negativas, promueve la activación de una cascada intracelular, que conlleva en la activación del factor de transcripción Relish, que se trasloca al núcleo y activa la expresión de los AMPs. Para una descripción más detallada ver el apartado 2.2 de la introducción. Modificada de (Ganesan et al., 2011).

de transcripción Relish para dar lugar a la expresión de una serie de genes de respuesta inmune, como el péptido antimicrobiano Diptericina (Figura 8) (Lemaitre et al., 1995; Corbo and Levine, 1996).

La expresión de los péptidos antimicrobianos en el cuerpo graso se considera una respuesta humoral sistémica ya que, desde el cuerpo graso se segregan a la hemolinfa para atacar a los microorganismos infecciosos. Además, también existe una respuesta inmune humoral local, como la que se da en los epitelios de las tráqueas y en el intestino que al estar continuamente expuesto a micro-organismos tienen una respuesta inmune local mediada por péptidos antimicrobianos específicos como la Cecropina en el intestino, cuya expresión está controlada por factores de expresión específicos de tejido, como es el caso del gen *caudal* (Ryu et al., 2008).

2. Mecanismo de regulación de la expresión génica

El uso de *Drosophila* como sistema modelo para el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión génica está siendo muy relevante, ya que estos mecanismos están conservados entre vertebrados y *Drosophila*. Además, los genes que están regulando estos procesos también se encuentran conservados.

En este apartado se describirán los mecanismos de regulación de la expresión génica que están relacionados con esta Tesis como son la regulación de la ruta de señalización de Imd (revisado en (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Aggarwal and Silverman, 2008; Ganesan et al., 2011)), la regulación epigenética mediada por las proteínas del grupo Polycomb y trithorax (revisado en (Schuettengruber et al., 2007; Schwartz and Pirrotta, 2008)), y los mecanismos de regulación mediados por los microRNAs (revisado en (Bushati and Cohen, 2007; Ruby et al., 2007; Fabian et al.; Inui et al., 2010; Sato et al., 2011)).

2.1 Ruta de Imd

La ruta de señalización de Imd comparte homología con la ruta de señalización del TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor) de mamíferos (Tabla 1), involucrada tanto en la recepción de patógenos como en la recepción de las señales de muerte (Tabla 1) (Ganesan et al., 2011). La ruta de Imd se activa cuando existe una infección producida por bacterias Gram-negativas, cuyo ácido meso-diaminopimélico (DAP), es reconocido por el receptor de membrana PGRP-LC (Peptidoglycan Recognition Protein-LC) (Figura 8) (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002). Este reconocimiento promueve la oligomeriza-

ción del PGRP-LC y el reclutamiento de los factores asociados al mismo como dFADD (*Drosophila* Factor Associated Death Domain) (Leulier et al., 2002; Naitza et al., 2002), DREDD (Death related ced-3/Nedd2-like protein) (Leulier et al., 2000) e IMD (Immune Deficiency) (Lemaitre et al., 1995; Corbo and Levine, 1996; Levashina et al., 1998). Recientemente, se ha descubierto que el reclutamiento de estas proteínas promueve la proteólisis de IMD y su ubiquitinación, necesarias para activar la cascada de señalización (Figura 8)(revisado en (Ganesan et al., 2011)).

Además, también recientemente se está poniendo en evidencia la importancia de los procesos de ubiquitinación y desubiquitinación de factores de esta vía para la activación y represión de la misma. La reacción de ubiquitinación involucra tres reacciones enzimáticas catalizada por tres tipos de proteínas diferentes, denominadas: Ub-activadora “E1”, Ub-conjugante “E2” y Ub-ligasa “E3”. La enzima “E1” cataliza el proceso de activación de la ubiquitina. La ubiquitina activada es transferida a la enzima “E2”. El complejo ubiquitina-E2 interacciona con la enzima E3 ubiquitin ligasa, que facilita la transferencia de la ubiquitina a su proteína sustrato (Figura 9) (revisado en (Pickart and Eddins, 2004)). Se sabe que para la ubiquitinación de IMD se necesita la presencia del complejo E2, formado por los factores Bendless, Effete y dUev1a, con propiedades de activación de la reacción de ubiquitinación (Zhou et al., 2005; Paquette et al., 2010). Además, también se necesita la proteína IAP2 (Inhibitor of Apoptosis 2), una E3 ubiquitin ligasa, encargada del proceso de ubiquitinación (Paquette et al., 2010). Se ha propuesto que esta ubiquitinación es requerida para la activación del complejo formado por TAK1 (TGF- β Activated Kinase 1) (Vidal et al., 2001; Silverman et al., 2003) y TAB2 (TAK1-Associated Binding Protein 2) (Kleino et al., 2005; Zhuang et al., 2006) y, por tanto, de la cascada. La activación de este complejo produce a su vez la activación de dos rutas de señalización distintas, por una parte la activación de la JNK (c-Jun N-terminal Kinases) (Sluss et al., 1996; Holland et al., 1997; Chen et al., 2002), y por otro lado la activación del factor de transcripción NF-KB/Rel (Figura 8) (Silverman et al., 2003)

<i>Drosophila</i>	Homólogo en mamíferos
PGRP	?
Imd	RIP1
Bendless	UBE2N
Effete	UBE2D2
Uev1a	UBE2V1
dIAP2	BIRC3
dFADD	FADD
Dredd	Caspasa-8
TAK1	MAP3K7
TAB2	TAB2
IKK β	IKK β
IKK γ	?
Relish	NFKB1
dUSP36	USP36
SKPA	SKP1
PIMS	?
caspar	FAF1

Tabla 1: Homología entre los genes de la ruta de Imd de *Drosophila* y vertebrados.

La activación del factor de transcripción NF-KB/Rel a partir del complejo TAK1/TAB2 tiene lugar a través de la activación del complejo IKK, que está formado por dos subunidades, IKK β e IKK γ codificadas por el gen *ird5* (*immune response deficient 5*) y *Kenny* respectivamente (Rutschmann et al., 2000; Lu et al., 2001). La activación de este complejo fosforila directamente a Relish, que a su vez es proteolizada por DREDD (Stoven et al., 2000), lo que da lugar a la traslocación al núcleo del dominio activador de esta proteína denominado RHD (Rel-Homology Domain), para producir la activación de una serie de genes de respuesta inmune, entre los que se encuentran los genes que codifican para los péptidos antimicrobianos (Figura 8) (Hedengren et al., 1999).

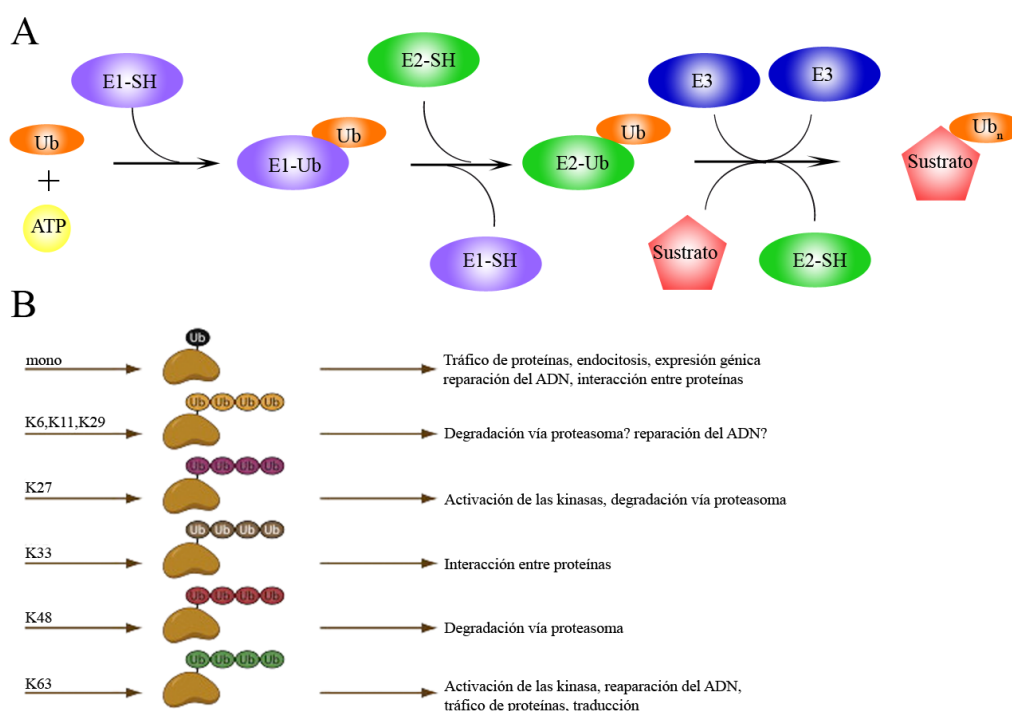


Figura 9: Proceso de ubiquitinación proteica. (A) La enzima E1 cataliza el paso de activación del proceso mediante el cual la E1 es ubiquitinada dando lugar a la E1-ubiquitinada (E1-Ub). A continuación, se produce la transferencia de la ubiquitina desde la E1-Ub a la enzima E2 dando lugar a la E2-ubiquitinada (E2-Ub). La enzima E3 cataliza la transferencia de la ubiquitina desde la E2-Ub al sustrato. **(B)** Las cadenas de poliubiquitinación pueden ser formadas a partir de cualquiera de los siete residuos de lisina presentes en la ubiquitina. La formación de los distintos tipos de cadenas poliubiquitinadas a partir de estos residuos da lugar a distintas actividades moleculares. Modificado de (Malynn and Ma, 2010).

La ruta de Imd no sólo tiene que ser activada en respuesta a la infección sino que, una vez resuelta la infección, esta tiene que ser regulada negativamente, ya que la expresión prolongada de los péptidos antimicrobianos es perjudicial para el organismo como se pone de manifiesto en las enfermedades autoinmunes humanas (revisado en (Turner et al., 2012)). Poco se sabe de la regulación negativa de la vía, aunque, se han descrito varios mecanismos de regulación, que actúan a distintos niveles en la cascada de Imd (Figura 8) (revisado en (Aggarwal and Silverman, 2008)). Por un lado, se ha

descrito que a nivel del receptor PGRP-LC la proteína PIMS (PGRP-LC- interacting inhibitor of IMD Signaling) inhibe la interacción entre el receptor PGRP-LC y la proteína IMD lo cual impide la activación de la cascada (Figura 8) (Aggarwal et al., 2008; Kleino et al., 2008; Lhocine et al., 2008). Como se ha comentado anteriormente, en la activación de la cascada, la ubiquitinación de la proteína IMD juega un papel muy importante. Recientemente se ha descrito que para la regulación negativa de la ruta, es importante la desubiquitinación de IMD, que es promovida por la proteína dUSP36 (Figura 8) (Thevenon et al., 2009). Esta desubiquitinación promueve que Imd se poliubiquitine con cadenas K-48 ubiquitinas, lo que conlleva la degradación de IMD vía proteasoma, promiando la inactivación de la cascada (Figura 8) (Thevenon et al., 2009). Por otro lado la proteína CASPAR inhibe la proteolización de Relish mediada por DREDD (Figura 8) (Kim et al., 2006). Además, se ha propuesto que la proteína SKPA (S-phase Kinase Associated Protein A) (Murphy, 2003), componente de un complejo con actividad E3 ubiquitin ligasa, ubiquitine a la proteína Relish, degradándola vía proteasoma, y por lo tanto, impidiendo la activación de los genes que codifican para los péptidos antimicrobianos (Figura 8) (Khush et al., 2002).

2.2 Regulación epigenética de la expresión génica mediada por la proteínas Polycomb y trithorax

Además de la regulación de la expresión génica producida por la activación de las proteínas en una ruta de señalización, es cada vez más relevante que la modificación del entorno cromatínico juega un papel importante en los procesos de regulación de la expresión génica, en particular la modificación de las histonas llevada a cabo por proteínas del grupo Polycomb (PcG) (Tabla 2) y trithorax (trxG) (Tabla 3) (revisado en (Schuettengruber et al., 2007; Schwartz and Pirrotta, 2008)). Las proteínas PcG y trxG, están conservadas en la evolución (Tabla 2 y 3), y fueron inicialmente descubiertas en *Drosophila* por su papel en el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos a lo largo de las divisiones celulares que tienen lugar en el desarrollo (Figura 10) (revisado en (Muller and Kassis, 2006; Schwartz and Pirrotta, 2007)). Se sabe ahora que estas proteínas regulan a muchos otros genes modificando post-traduccionalmente las histonas. Por ejemplo, la ubiquitinación de la Histona H2A mediada por proteínas PcG mantiene reprimida la expresión génica ((Wang et al., 2004; Cao et al., 2005; Gutierrez et al., 2011)), al igual que la tri-metilación de la histona H3 en la Lisina 27 mediada también por proteína PcG (Cao and Zhang, 2004).

Los mecanismos por los que estas proteínas actúan están siendo muy estudia-

Gen	Proteína	Complejo	Homólogo	Actividad bioquímica
<i>Dorsal switch protein 1</i>	Dsp1		HMGB2	
<i>grainy head</i>	Grh		GRHL1	
<i>Trithorax-like</i>	Gaga factor/Trl			
<i>lola like</i>	Lolal			
<i>pipsqueak</i>	psq			
<i>zeste</i>	z			
<i>Pleiohomeotic</i>	pho	PHO-Rc	YY1	Une DNA
<i>Pleiohomeotic like</i>	pho-l	PHO-Rc	YY2	Se une a la H3K9 y H4K20 mono y di-metilada
<i>Scm-related gene containing four mbt domains</i>	dSfmbt	PHO-Rc	L3MBTL2	
<i>Retinoblastoma-family protein</i>	Rbf		RB1/ RBL1	
<i>Enhancer of zeste</i>	E(z)	PRC2	EZH2/ EZH1	Metilación de la H3K9 y H3K27
<i>extra sexcombs</i>	esc	PRC2	EED	Co-factor para E(z)
<i>escl</i>	escl	PRC2		
<i>Suppressor of zeste 12</i>	Su(Z)12	PRC2	SUZ12	Co-factor para E(z)
<i>Chromatin assembly factor 1 subunit</i>	Nurf-55 (Caf1)	PRC2	RBBP4/RbpAp48	
<i>Polycomblike</i>	Pcl	PRC2 associated factors	PHF1	
<i>Rpd3</i>	Rpd3	PRC2 associated factors	HDAC2	Histona deacetilasa
<i>Sir2</i>	Sir2	PRC2 associated factors	SIRT1	
<i>Sex combs extra</i>	Sce/ dRING	PRC1	RNF/RING1B/ RING2	E3 ubiquitin ligasa para la H2AK119
<i>Polycomb</i>	Pc	PRC1	CBX2/HPC1/M33 CBX4/HPC2 CBX8/HPC3/PC3	Une H3K27me3
<i>polyhomeotic proximal</i>	ph-p	PRC1	PHC1 PHC2 PHC3	
<i>polyhomeotic distal</i>	ph-d	PRC1		
<i>Posterior sex combs</i>	Psc	PRC1	BMI1	Co-factor para dRING
<i>Sex comb on midleg</i>	Scm	PRC1	SCMH1	

Tabla 2: Genes PcG, función y complejos a los que pertenecen.

dos debido a su importancia global en la regulación de la expresión génica y también, debido al importante papel que juegan en el desarrollo normal y en el desarrollo patológico de las enfermedades ya que intervienen en procesos como la hematopoyesis y la proliferación celular (Remillieux-Leschelle et al., 2002; Gonzalez et al., 2009; Martinez et al., 2009). Se sabe que en *Drosophila* estas proteínas reconocen sus genes diana por la pre-

sencia en ellos de los denominados Polycomb Response Elements (PREs) y Trithorax Response Elements (TREs) existentes en su secuencia génica (Figura 10) (Simon et al., 1993). Varias proteínas PcG se unen al ADN de forma específica, aunque una de las proteínas más estudiadas, la proteína Pleiohomeotic (PHO), se postula como la proteína responsable de reclutar al ADN los distintos complejos proteicos formados por pro-

teínas PcG o proteínas trxG (Figura 10) (Klymenko et al., 2006).

Además de las proteínas PcG, que tienen un papel fundamentalmente represor, y las proteínas trxG, cuyo papel principal es activador, existe otro grupo de proteínas denominadas

Gen	<i>Drosophila</i>	Complejo	Homólogo	Actividad bioquímica
<i>Brahma</i>	Brm	SWI/BRM	SMARCA2/BRM	ATPasa
<i>Osa</i>	Osa	SWI/BRM	ARID1A/BAF250	
<i>Moir</i>	Mor	SWI/BRM	SMARCC2/BAF17A	
<i>Snf5-related 1</i>	Snr1	SWI/BRM	SMARCB1/hSNF5/BAF47	
<i>Imitation SWI</i>	lswi	NURF	SMARCA1/SNF2L/ISWI	
<i>Nucleosome remodeling factor - 38kD</i>	Nurf-38	NURF		
<i>Chromatin assembly factor 1 subunit</i>	Nurf-55(Caf1)	NURF	RRBP4/rbpAp48 o RNNP7/RbAp46	
<i>Enhancer of bithorax</i>	E(bx)/Nurf-301	NURF		
<i>trithorax</i>	Trx	TAC1	MLL/ALL-1	Metilación de la H3K4
<i>nejire</i>	nej/dCBP	TAC1		
<i>SET domain binding factor</i>	Sbf1	TAC1		
<i>absent, small, or homeotic discs 1</i>	Ash1	ASH1		Metilación de la H3K9, H3K4 y de la H4K20
<i>nejire</i>	nej/dCBP	ASH1		

Tabla 3: Genes trxG, función y complejos a los que pertenecen.

ETPs (Enhancer of Tritheorax and Polycomb) (Busturia et al., 2001; Faucheux et al., 2003; Bejarano and Busturia, 2004). Mutaciones en este tipo de genes aumentan el fenotipo de mutaciones en genes *PcG* y/o *trxG*, sugiriendo que estos genes son requeridos para la represión y activación por parte de las proteínas PcG y/o *trxG* respectivamente. Además, estudios moleculares y genéticos han demostrado que estas proteínas pueden actuar como represores o activadores, es decir, que pueden interaccionar con PcG y/o *trxG* dependiendo del contexto celular y del momento del desarrollo (Busturia et al., 2001; Bejarano and Busturia, 2004).

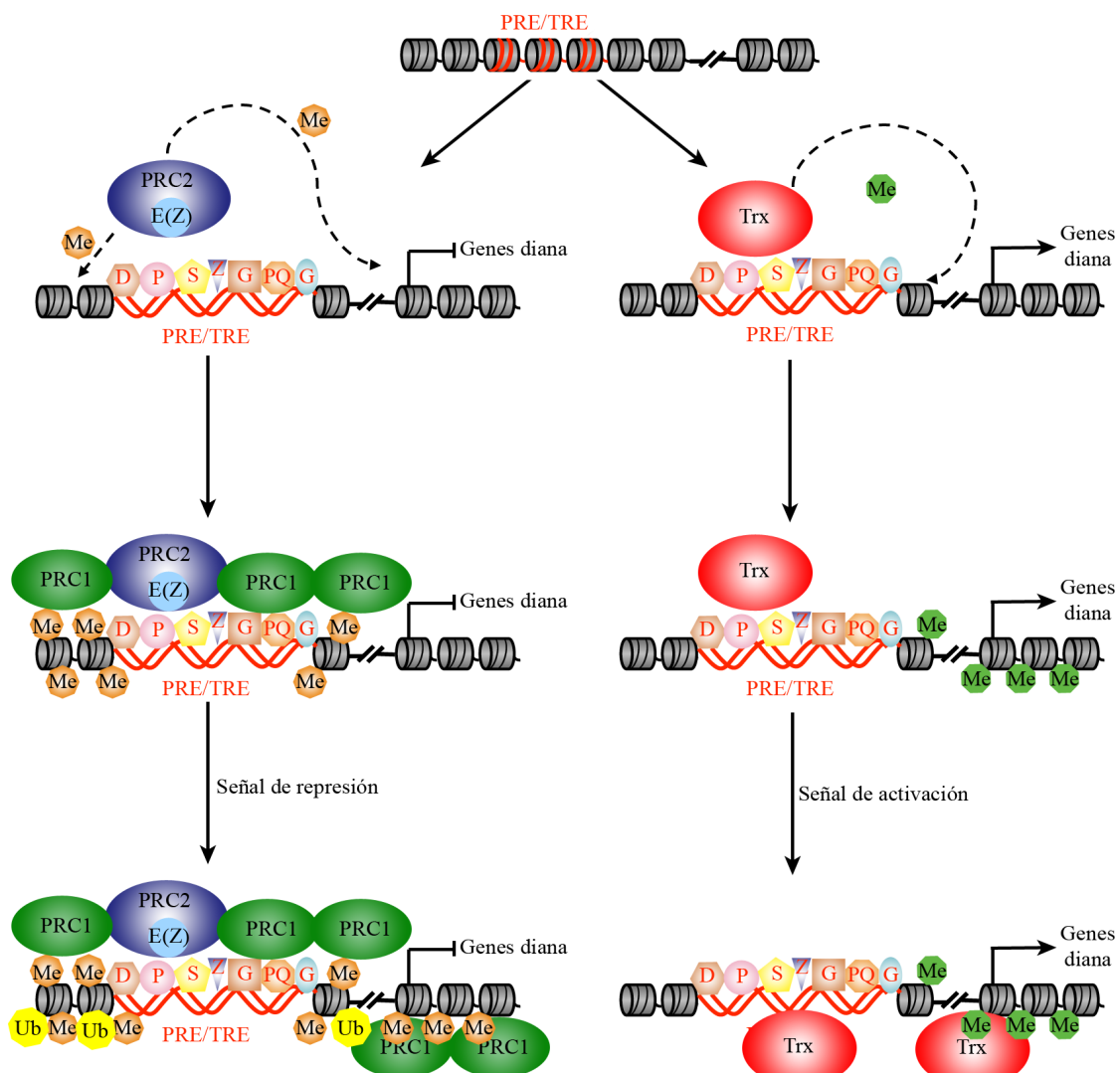


Figura 10: Mecanismos de mantenimiento de la expresión génica mediado por las proteínas PcG/trxG. Las proteínas de unión a ADN pertenecientes a las proteínas PcG/trxG se unen a los PRE/TREs y reclutando al complejo PRC2 que metila las histonas y recluta al complejo PRC1 que se encarga de la ubiquitinación de las histonas reprimiendo la expresión génica. Por otro lado el reclutamiento de las proteínas de unión a ADN también, da lugar al reclutamiento de los complejos *trx*, lo que conlleva una activación de la expresión génica mediante acetilación o ubiquitinación de las histonas. . Ver texto.

Una de las proteínas ETP, objeto de estudio de esta Tesis, es la proteína dRYBP (*Drosophila* Ring and YY1 Binding Protein) (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008) conservada filogenéticamente y que fue inicialmente descubierta en ratón debido a su interacción con el “Ring domain” de la proteína SCE, del grupo Polycomb (Garcia et al., 1999). La proteína dRYBP posee, en su N-terminal, un dominio NZF (Nucleoporin Zinc Finger) conservado de ubiquitinación y que se ha demostrado es la región donde RYBP de ratón se monoubiquitina y donde interacciona con proteínas ubiquitinadas (Arrighi et al., 2006). Además, ahora también se sabe que altos niveles de la proteína dRYBP inducen apoptosis y que esta apoptosis es dependiente de los factores DREDD y dFADD (Gonzalez and Busturia, 2009), ambos involucrados en la vía de Imd, involucrada en la respuesta inmune de *Drosophila* (Figura 8 y revisado en (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Ganesan et al.)). El estudio de la función de la proteína dRYBP como proteína ETP y como proteína involucrada en la respuesta inmune han sido objeto de estudio de esta Tesis.

2.3 Regulación de la expresión génica mediada por microRNAS

Los micro-RNAs son pequeñas moléculas de ARN no codificantes que han sido implicadas en los mecanismos de regulación negativa de la expresión génica (Figura 11) (revisado en (Bushati and Cohen, 2007; Fabian et al., 2010)). Actúan generalmente produciendo una des-estabilización del mRNA del gen diana, inhibiendo por lo tanto su traducción (Figura 11) (revisado en (Bushati and Cohen, 2007; Fabian et al., 2010)).

Los microRNAs son sintetizados por la RNA polimerasa II, que da lugar a un pri-microRNA que una vez poly-adenilado es procesado por un complejo denominado “Microprocessor” que está formado por las proteínas DROSHA, con actividad RNasa y la proteína “double-stranded RNA-binding domain” (dsRBD) DGRC8/Pasha. Este procesamiento da lugar a una molécula de RNA de menor tamaño denominada pre-microRNA, que es exportada al citoplasma por

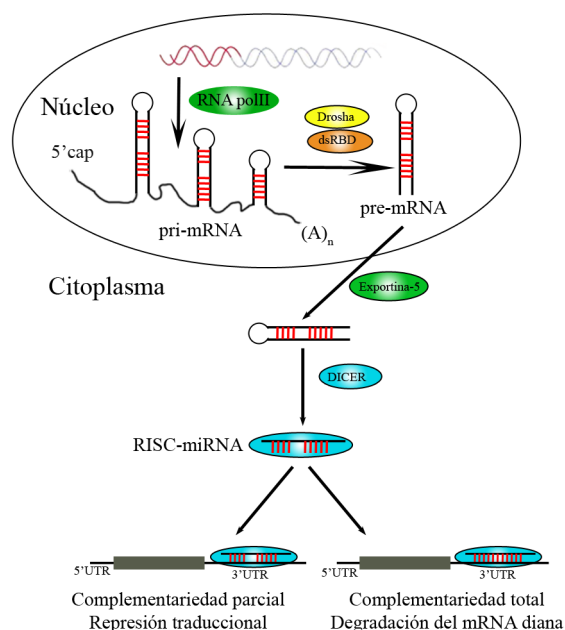


Figura 11: Procesamiento y generación de los microRNAs. Ver texto. Modificada de (He and Hannon, 2004).

la proteína exportina-5. Esta molécula de RNA es de nuevo procesada por otro complejo formado por la enzima DICER (RNAsa III), que genera el microRNA maduro (Figura 11). Una vez se ha generado el microRNA maduro éste se une a su gen diana produciendo su represión.

Es cada vez más relevante que los microRNAs juegan un papel crucial en el desarrollo de los individuos (revisado en ((Bushati and Cohen, 2007; Fabian et al., 2010))). Se sabe que los microRNAs regulan la expresión génica mediante la unión de estos a la región 3'UTR de su gen diana (Eulalio et al., 2007; Parker and Sheth, 2007)). Esta unión da lugar a la formación del complejo denominado miRISCs (miRNA-induced silencing complexes), formado por el microRNA, el gen diana y diversas proteínas entre las que se encuentra Argonauta (AGO) (revisado en (Eulalio et al., 2008; Chekulaeva and Filipowicz, 2009))). Los microRNAs pueden regular la expresión génica por dos mecanismos: 1) inhibiendo el inicio de la traducción y/o la elongación ((Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993; Olsen and Ambros, 1999)), y 2) por facilitar la desadenilación del ARN mensajero, y consecuentemente degradándolo (Figura 11) ((Bagga et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Schmitter et al., 2006))).

Aunque los microRNAs han sido descubiertos hace relativamente poco, se sabe que en *Drosophila* existen al menos 148 micro-RNAs (Ruby et al., 2007). Modelos teóricos predicen que los microRNAs están formando parte de las redes de regulación génica formando bucles de regulación coherentes entre el micro-RNA y su gen diana y bucles de regulación incoherentes en los que el gen diana del micro-RNA es activado por una señal, y a su vez esta señal activa la expresión del microRNA, que regula negativamente la expresión del gen diana (revisado en (Inui et al., 2010))). Por otro lado un mismo gen puede estar regulado por distintos microRNAs, permitiendo una regulación espacio-temporal del gen dependiendo de la expresión del microRNA (revisado en (Inui et al., 2010))).

OBJETIVOS

Objetivos:

La regulación epigenética mediada por los genes del grupo *Polycomb* fue inicialmente descubierta en *Drosophila* por su papel en el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos. Sin embargo, trabajos en vertebrados y trabajos emergentes en *Drosophila* ponen en evidencia que su rango de actuación se amplía a muchos otros procesos biológicos. En este trabajo de Tesis, se tuvo como objetivo el estudio de la función del gen *dRYBP*, y otros genes del grupo *Polycomb*, en distintos procesos biológicos, como por ejemplo, el sistema inmune. Además, debido a que la expresión de todos los genes del grupo *Polycomb*, por ahora descrita, es ubicua durante todo el desarrollo de *Drosophila*, se estableció como objetivo de esta Tesis, estudiar la regulación de su expresión mediada por microRNAs.

Los Objetivos de esta Tesis fueron:

- 1- Estudiar la función del gen *dRYBP* (*Drosophila Ring and YY1 Binding Protein*) en el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos.
- 2-Analizar la función de las proteínas dRYBP y del grupo Polycomb en la hematopoyesis.
- 3-Investigar la regulación de la respuesta inmune mediada por dRYBP.
- 4-Estudiar la regulación de *dRYBP* mediada por microRNAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de moscas utilizadas:

Las cepas de moscas utilizadas fueron:

- 1) Moscas tipo salvaje: Canton-S, Oregon-R (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>)
- 2) Moscas conteniendo mutaciones y deficiencias genómicas: $y^1, Df(1)^{w67c23}$, $dRYBP^1$, $dRYBP^{\Delta 16}$ y $dRYBP^{\Delta 55}$, $dRYBP^1, HisIII::GFP$ (Gonzalez et al., 2008), $Df(2R)BSC598$, $Df(2R)BSC787$ (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>), Sce^1 (Breen and Duncan, 1986), Pc^3 (Breen and Duncan, 1986), trx^{E2} (Kennison and Tamkun, 1988), $Dfexu^1$ (Hazelrigg et al., 1990) y $miR-7^{\Delta 1}$ (Li and Carthew, 2005).
- 3) Moscas transgénicas conteniendo construcciones UAS: $UAS\ dRYBP_{RNAi}$ (Gonzalez et al., 2008), $UAS\ Su(z)12_{RNAi}$, $UAS\ pho_{RNAi}$, $UAS\ ph_{RNAi}$, $UAS\ E(Z)_{RNAi}$, $UAS\ esc_{RNAi}$ y $UAS\ Sce_{RNAi}$ y los ARN interferentes utilizados en la búsqueda de genes que interaccionan con dRYBP (Vienna Drosophila RNAi Center, VDRC <http://stockcenter.vdrc.at/control/main> (Dietzl et al., 2007), $UAS\ pho$ (Duchow et al., 2005), $UAS\ ph$ (Netter et al., 2001), $UAS\ Imd$ (Georgel et al., 2001), $UAS\ Bendless$ (Bellen et al., 2004), $UAS\ Effete$ (Stock Center by Annette Parks and Marc Muskavitch, Boston College.), $UAS\ ird-5$ (Bellen et al., 2004), $UAS\ Rel\ HH$ (Hedengren et al., 1999), $UAS\ skpA_{RNAi}$ (Transgenic RNAi Project, <http://www.flyrnai.org/TRiP-HOME.html>), $UAS\ dRYBP$ (Gonzalez and Busturia, 2009), $UAS\ miR-7-Ds-Red$ (Stark et al., 2003), $UAS\ miR-iab4-3p-Ds-Red$ (Ronshaugen et al., 2005), $UAS\ miR-284-Ds-Red$, $UAS\ miR-304-Ds-Red$ y $UAS\ miR-306-Ds-Red$ (generadas en el laboratorio).
- 4) Moscas transgénicas conteniendo construcciones GAL4: $enGal4$ (Brand and Perrimon, 1993), $SdGal4$ (Calleja et al., 1996), $ciGal4$ (cedida por el Doctor R. Holmgren), $HeGal4$ (Zettervall et al., 2004), $nubGal4$ (Calleja et al., 1996), $HmlGal4$ (Sinenko and Mathy-Prevot, 2004), $HsGal4$ (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>), $C564Gal4$ (Zettervall et al., 2004), $daGal4$ (Leulier et al., 2002), $LSP2Gal4$ (Lazareva et al., 2007), $tubGal80ts$ y $MS444Gal4$ (cedido por la Dra N. Azpiazu).
- 5) Moscas transgénicas conteniendo construcciones reporteras de la expresión: $PBX\ MCP\ Ubxpp\ LacZ$ (Busturia et al., 2001), $Drs[GFP]\ Dpt[LacZ]$ (Leulier et al., 2002) y $Drs[GFP]\ Dpt[LacZ]; dRYBP^1/CyOGFP$, generada en el laboratorio.

2. Obtención de moscas transgénicas

Para la obtención de moscas transgénicas se siguieron protocolos establecidos (Rubin and Spraling, 1982), utilizándose como huéspedes para el ADN foráneo embriones de la cepa $y^1, Df(1)w^{67c23}$ (<http://flybase.org/>), que presentan una mutación en el gen *yellow* y deleciona el gen *white*. La concentración de ADN que se inyectó fue de 0,4mg/ml junto con un plásmido de ADN que codifica para la transposasa a una concentración de 0,1mg/ml. Las moscas resultantes (generación G0), se cruzaron con $y^1, Df(1)w^{67c23}$ para la identificación de los individuos transformantes. Para la localización y el balanceo de los transformantes se utilizó el stock $Df(1)w^{67c23}; if/CyO; MKRS/TM6B$. Las moscas fueron inyectadas por el servicio de generación de transformantes de la plataforma Consolider *Drosophila*.

3. Expresión ectópica

Para la sobre-expresión de genes, ARN interferentes o microRNAs se utilizó el sistema UAS/GAL4 (Brand and Perrimon, 1993). Con este sistema se puede controlar la sobre-expresión de estas construcciones conteniendo las secuencias UAS en distintos tiempos del desarrollo y en diferentes regiones del cuerpo utilizando las distintas líneas de moscas transgénicas que contienen la proteína GAL4 cuya expresión es dependiente de temperatura. En los experimentos llevados a cabo en este trabajo las moscas se sometieron a 17°C, 25°C o 29°C dependiendo de las exigencias experimentales. En el caso de las moscas conteniendo la construcción *HsGal4* las larvas o las moscas se sometieron durante 1 hora a 37°C y se mantuvieron durante 7h o 23h a 29°C según las condiciones experimentales. Además, también se utilizó la proteína Gal80ts que actúa como inhibidor de la proteína Gal4.

4. Cepas bacterianas utilizadas para la infección de moscas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo de Tesis fueron:

Micrococcus luteus (*M. luteus*): bacteria Gram-positiva que induce, en las moscas infectadas, una fuerte expresión del péptido antimicrobiano Drosomicina.

Erwinia carotovora carotovora 15 rif^R (*Ecc15*): bacteria Gram-negativa que induce, en las moscas infectadas, una fuerte expresión del péptido antimicrobiano Diptericina.

5. Infección de moscas

Para la infección de moscas adultas por vía oral, las moscas se mantuvieron en

ayuno durante dos horas. Seguidamente, se transfirieron a un tubo con papilla estándar en el que se colocó un papel de filtro embebido en 100µl de una solución acuosa con 5% de sacarosa, y 100µl de un pellet bacteriano ($OD_{600nm}=200$). Transcurridas 16 horas a 29°C, se recogieron las moscas para, o bien extraer el ARN, o realizar una tinción del intestino y/o el cuerpo graso.

La infección sistémica de moscas adultas se realizó mediante el pinchazo en el lateral del tórax del adulto con una aguja de tungsteno (0,5 mm de diámetro), previamente introducida en un cultivo bacteriano a una densidad óptica de $OD_{600nm}=200$.

6. Análisis de la supervivencia

Se infectaron 30 hembras adultas mediante pinchazo en el tórax con una aguja de tungsteno embebida en un cultivo bacteriano de *Ecc15* ($OD_{600nm}=200$). Las moscas fueron contadas y transferidas a viales frescos todos los días, durante un periodo de 8 días.

7. Tinción histoquímica con X-gal

La disección de los órganos de larvas o de individuos adultos se realizó en PBS (137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 2mM K_2HPO_4 , pH 7,4) y se transfirieron a una solución de PBS con glutaraldéhidio al 0,5% durante 10 min. en hielo. Transcurrido este tiempo, se lavaron 3 veces con PBS durante 10 min. Por último se incubaron las muestras en 1ml de solución (10mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 , 150mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, 3,5mM K_3FeCN_6 , 3,5mM K_4FeCN_6 , pH a 7,2) conteniendo 30µl de X-gal (Promega). Las muestras se incubaron a 37°C hasta que se desarrolló una coloración azul.

8. Inmuno-histoquímica

8.1 Fijación de embriones:

Los embriones se recogieron en el estadio de desarrollo apropiado para cada experimento, y se decorionaron con lejía durante 2 min., a continuación se lavaron con agua y se recogieron en un tubo de 1,5 ml con 500µl de Heptano. Seguidamente se añadió 500µl de Formaldehído al 4% y se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido este tiempo se retiró la fase acuosa (fase inferior) y se desvitelinizaron añadiendo 500

l de Metanol y agitando durante 20 seg. Posteriormente se procedió a la eliminación de la mezcla Heptano-Metanol y se lavaron 3 veces durante 10 min. con Metanol y

3 veces durante 5 min. con PBT (0,3% de Triton en PBS).

8.2 Fijación de discos imaginales, de intestino y de cuerpo graso:

Los órganos se diseccionaron en PBS y se fijaron durante 30 min., a temperatura ambiente en agitación en 500l de una solución de PBS conteniendo 4% de Paraformaldehído, 5µl de Triton X-100 al 10% y 5µl de Dioxicolato al 10% (PBS-PFA).

8.3 Fijación de tumores melanóticos:

Los tumores melanóticos se diseccionaron en PBS con pinzas afiladas y se traspasaron a un portaobjetos eliminando el exceso de líquido. Se calentaron a 80°C durante 40 seg. y se congelaron en hielo seco. Por último se fijaron con PBS-PFA durante 30 min. a temperatura ambiente.

8.4 Inmuno-histoquímica para microscopía de fluorescencia

Los tejidos fijados se incubaron con PBT-BSA (PBT más 0,5% de BSA) durante 30 min. en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4) en PBT-BSA durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron 3 veces durante 10 min. con PBT-BSA y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (acoplado a un fluoróforo (ver Tabla 4)) en PBT-BSA durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, las muestras se lavaron 3 veces durante 10 min. en agitación con PBT y se montaron en Vectashield H-100 (ATOM). Las imágenes

Anticuerpos primarios		
Anticuerpo	Dilución	Especie
dRYBP	1/100	conejo
Cut	1/20	ratón
He	1/100	ratón
Abd-B	1/20	ratón
Ubx	1/20	ratón
Crq	1/1000	conejo
Caspasa-3	1/20	conejo
Senseless	1/100	cobaya
Anticuerpos secundarios fluorescentes		
Anticuerpo	Dilución	Especie
Alexa 488 (anti-ratón)	1/200	mono
Alexa 488 (anti-conejo)	1/200	mono
Alexa 555 (anti-ratón)	1/200	mono
Alexa 555 (anti-conejo)	1/200	mono
Alexa 555 (anti-cobaya)	1/200	cabra
Alexa 647 (anti-conejo)	1/200	mono
Alexa 647 (anti-ratón)	1/200	mono
Anticuerpos secundarios biotinilados		
Anticuerpo	Dilución	Especie
anti-ratón	1/200	conejo
anti-conejo	1/200	ratón
Marcadores celulares		
Marcador	Dilución	Marcaje celular
Faloidina	1/500	Membrana
To-Pro 3	1/500	Núcleo

Tabla 4: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

fueron tomadas en un microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio vertical Axio Imager.Z1 M (Zeiss). Las imágenes fueron procesadas con el programa informático Photoshop CS3.

8.5 Inmuno-histoquímica para microscopía visible

Los embriones o tejidos fijados se incubaron en PBT-BSA durante 30 min. en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4) en PBT-BSA durante toda la noche a 4°C. A continuación, se lavaron 3 veces en PBT-BSA durante 10 min. a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (conjugado con Biotina (ver tabla 4)) en PBT-BSA durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. En paralelo, se preparó el Complejo Avidina/Biotina (ABC) mediante la incubación de 5µl de Avidina y 5µl de Biotina acoplada a Peroxidasa en 490µl de PBS durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario las muestras se lavaron 3 veces con PBT durante 10 min. y se incubaron durante 30 min. en agitación con el complejo ABC. Tras esto se lavaron 3 veces con PBT durante 10 min. Una vez lavadas las muestras se transfirieron a un pocillo y se reveló la tinción con 500µl de DAB (10 mg/ml) y 1µl de H₂O₂ al 3%. La reacción se dejó desarrollar hasta detectar coloración marrón. Para detener la reacción se añadió PBT. Los discos imaginale se montaron en Glicerol al 90%. Los embriones fueron montados en Epón, para lo cual se deshidrataron en etanol al 60, 70, 80, 90 y 100% con PBS, posteriormente se dejaron toda la noche a 60°C en una mezcla 1/1 de Acetona/Epón, y se montaron en Epón. Las imágenes fueron realizadas en un microscopio vertical Axioskop2 Plus (Zeiss) acoplado a una cámara CCD color. Las imágenes fueron procesadas con el programa informático PhotoShop CS3.

9. Western-Blot

Las proteínas se extrajeron de 20 larvas homogeneizadas en 500µl de buffer de lisis (Triton X-100 1%, 50mM de Tris HCl ph 7.4-7.6, 150mM de NaCl, 2mM de EDTA, y una tableta de un inhibidor de proteasas (Roche)). El homogeneizado se centrifugó a 15000rpm durante 10 min. a 4°C. Seguidamente se cogieron 10µl del lisado y se mezclaron con 10µl del buffer de carga 2X. La mezcla se corrió en un gel de Poli-acrilamida al 10%. Realizada la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de Nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham). La membrana se aclaró un par de veces en solución de lavado (PBT más 0,5% de Tween-20) y se bloqueó durante 1 hora en solu-

ción de bloqueo (PBS más 3% de BSA). Después, se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario en solución de lavado más 1% de BSA (anti-relish 1:100 ó anti-tubulina 1:5000, desarrollados en ratón). Se lavó la membrana 3 veces durante 10 min. con solución de lavado, y se añadió el anticuerpo secundario (Anti-ratón acoplado a peroxidasa (1:20000)), durante 1 hora y 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se reveló la membrana añadiendo 10 ml de NBT/BCIP (SIGMA) hasta que se visualizaron las bandas de proteínas.

10. Citometría de flujo

Se utilizó la citometría de flujo para estudiar el número total de hemocitos en larvas usando el analizador de citometría de flujo DIVA cell Sorter (Instituto de Salud Carlos III). El ciclo celular de las células de los discos imaginales se analizaron en un FACSCVantage SE (CBM- servicio de citometría de flujo). La fase del ciclo celular fue analizada con el software informático FlowJo 7.2.2.

Para analizar el número de hemocitos totales se extrajo la hemolinfa de, al menos, 15 larvas en PBS conteniendo 1% de suero fetal bovino (PBS-SFB). A continuación se centrifugaron los hemocitos a 120 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 100µl de PBS-SFB al cual se le añadió el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4) y se incubaron las células durante 15 min. a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células 2 veces en 1ml de PBS, seguidamente se añadió el anticuerpo secundario incubándolo 15 min. a temperatura ambiente (Tabla 4). transcurrido este tiempo se lavaron las células 2 veces y se resuspendieron en 100µl de PBS al que se añadió 50µl de Ioduro de Propidio, que marca las células muertas.

Para el análisis del ciclo celular en células de discos imaginales se diseccionaron al menos 60 discos de cada genotipo en medio de cultivo M3 (1 litro de medio de cultivo M3 contiene 450 ml Shields and Sang M3 insect medium (Sigma #S3652), 50 ml Fetal Bovine Serum (JRH #12103-78P), 5 ml de Penicillin-Streptomycin (Gibco #15070-063), 20 mg/ml Insulin (Sigma #I6634) esterilizado con filtros de 0,2 mm). A continuación se centrifugaron los discos imaginales durante 5 min. a 3000 rpm y se retiró el M3, los discos se incubaron en 300µl de Tripsina y 0,5µl de Hoechst 33342 (Sigma) durante 35 min. a 28°C en agitación. Para disgregar las células de los discos se pipeteó en la solución de Tripsina y Hoechst. Una vez disgregadas, se añadieron 200µl de PBS-SFB y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadan-

te y se re-suspendieron las células en 300µl de PBS-SFB.

11. Hibridación “*in situ*”

Las soluciones necesarias para este protocolo fueron preparadas con H₂O destilada tratada con DEPC (Diethyl Pirocarbonato, un inhibidor de RNA_{asas}). La hibridación “*in situ*” se realizó con la sonda miR-7LNA (Exiqon, #38485-01#). Se diseccionaron larvas de tercer estadio en PBS y se incubaron durante 20 min. en PBS-PFA. A continuación, se volvieron a incubar 15 min. en PBT-PFA y se lavaron 3 veces durante 5 min. en PBT. Posteriormente se incubaron los discos con proteinasa K (10 mg/ml (SIGMA)) durante 1 min. en agitación, se lavaron 2 veces durante 2 min. con PBT conteniendo 2mg/ml de glicina, y dos veces durante 5 min. con PBT. Tras los lavados, los discos se incubaron durante 20 min. en PBS-PFA y se volvieron a lavar 3 veces durante 5 min. con PBT. A continuación, se lavaron en una solución 1:1 PBT:SH (SH: solución de hibridación compuesta de 50% de formamida, 5X SSC (SSC 20X, 500ml 87,65 g de NaCl y 44,1 g de citrato sodico), 0,1 mg/ml tRNA de levadura, 5mM EDTA, 50 mg/ml de heparina, 0,1% de Tween 20, 5 mg/ml de un oligo de DNA de 28 nucleótidos y 40mM de ácido cítrico), durante 5 min. lavándose posteriormente durante 5 min. en SH. Los discos se pre-hibridaron en SH durante 1 hora a la temperatura de hibridación, la temperatura de hibridación se calcula restando 20 ó 25°C a la temperatura de “melting” de la sonda, la temperatura de “melting” de la sonda aquí utilizada es de 73°C, por lo que la temperatura de hibridación es de 48°C. Transcurrido el tiempo de pre-hibridación los discos imaginales se incubaron con la sonda miR-7LNA en SH (1:100), durante toda la noche a 48°C. A continuación, se eliminó la sonda y los discos fueron lavados durante 20 min. a 48°C con SH. Seguidamente fueron lavados con diluciones secuenciales de SH:PBT (3:1, 1:1, 1:3), cada una durante 10 min. a 48°C. Para continuar, se lavaron los discos 5 veces con PBT durante 20 min. a 48°C y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-DIG (ROCHE, previamente pre-absorbido con embriones), a una dilución (1:1000 en PBT), durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación los discos se lavaron 4 veces durante 10min. en PBT y dos veces en buffer AP (100mM Tris pH 9.5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl 0,1% Tween 20), durante 5 min. Seguidamente se incubaron en 1 ml de buffer AP conteniendo 20µl NBT/BCIP (Sigma). Una vez que se ha desarrollado la tinción, generalmente en 15 horas, se lavaron dos veces en PBS durante 10 minutos y se fijaron durante 10 min. en PBT-PFA. Finalmente se lavaron en PBS y se montaron en Glicerol al 90%. Las fotos fueron realizadas en un microscopio vertical Axioskop2 Plus (Zeiss) acoplado a una cámara CCD color, las imágenes fueron procesadas con el

programa informático PhotoShop CS3.

12. Estimación del número de “Crystal cells”

Para hacer una estimación del número de “Crystal cells” se sometieron las larvas de tercer estadio (crecidas en papilla conteniendo Azul de Bromofenol para seleccionar el estadio larvario) a un choque térmico durante 15 min. a 60°C en PBS precalentado. Las imágenes se realizaron en una Lupa MZ6 (6.3X a 40X) (Leica) acoplada a una cámara fotográfica digital réflex EOS 450D (Canon). Una vez tomadas las imágenes se contaron manualmente el número de “Crystal cells” de las mismas.

13. Preparación de cutículas adultas y larvarias para su observación microscópica

Para la preparación de cutículas adultas, las moscas o las partes de las moscas diseccionadas se calentaron en una solución acuosa de KOH al 10% durante 3 min. a 90°C. Una vez retirada la grasa, las cutículas se lavaron en agua y se deshidrataron en Etanol al 50% en agua y posteriormente en Etanol 96%. Finalmente las cutículas se montaron en Euparal.

Para la preparación de cutículas larvarias, los embriones se dejaron desarrollar durante 24 horas. Los embriones se decorionaron con lejía durante 2 min. y se desvitelinizaron en una solución 1:1 Heptano:Metanol mediante agitación durante 20 segundos, se lavaron con Metanol y posteriormente con PBS. Las cutículas larvarias fueron montadas en Hoyer conteniendo ácido láctico e incubadas a 65°C durante toda la noche.

14. PCR cuantitativa:

La extracción del ARN se realizó con agua tratada con DEPC. La extracción de ARN tanto de larvas de tercer estadio como de adultos, se llevó a cabo mediante la homogenización manual de 15 larvas o 10 adultos en 500µl de Trizol (Invitrogen). A continuación, se añadieron 150µl de Cloroformo y la mezcla se agitó durante 15 seg. en un vortex y se centrifugó durante 15 min. a 13000rpm a 4°C. Se recogieron 200µl de la fase acuosa (fase superior) en un tubo eppendorf de 1,5ml, se añadieron 200µl de Isopropanol, y se mezcló invirtiendo el tubo 3 o 4 veces. Posteriormente, se centrifugo a 13000rpm durante 15 min. a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado (ARN) dos veces con Etanol al 70% mediante centrifugación durante 15 min. a 13000 rpm a 4°C. Una vez eliminado el Etanol, el tubo conteniendo el precipitado de ARN se

introdujo en una estufa a 37°C durante 30 min. y se disolvió el ARN en 30µl de agua DEPC. La concentración del ARN fue medida en el espectofotómetro Nanodrop ND-1000, y la calidad del ARN se analizó en el “Bioanalizador Agilent 2100”.

Para la obtención del ADN complementario mediante la reacción de retro-transcripción se utilizó 1µg del ARN, siguiendo las instrucciones del kit de Applied Biosystem (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit). La reacción se llevó a cabo durante dos horas a 37°C en el termociclador Applied Biosystem GeneAmp 9700.

Para la realización de la qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), se utilizó el Kit de Applied Biosystem (Power SYBR Green PCR Master Mix) utilizando el termociclador ABI PRISM 7900HT SDS. De una forma general, las condiciones para la realización de la qPCR fueron:

Desnaturalización: 10 min a 95°C.

45 Ciclos de: 10s a 95°C, 10s a 60°C, 15s a 72°C.

Curva de “Melting”: 10s a 95°C, 10s a 60°C, 15s a 72°C y un paso final de 70°C a 95°C aumentando la temperatura 0,1°C/s.

La tabla 5 muestra los oligos utilizados en los distintos experimentos realizados en este trabajo de tesis. La eficiencia de los oligos fue calculada en aquellos casos en los que los oligos fueron diseñados en el laboratorio. Para el cálculo de la eficiencia de los oligos se realizaron diluciones seriadas (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) de una muestra de ADN complementario de moscas silvestres. La qPCR de estas muestras da como resultado la obtención de una pendiente, a partir de la cual, se obtiene la eficiencia de los oligos al aplicar la siguiente formula matemática: $10^{-1/\text{pendiente}}$.

La cuantificación relativa de la expresión génica de los genes de interés se llevó a cabo utilizando la siguiente formula matemática $RE = (E_{\text{ref}})^{CP_{\text{ref}}} / (E_{\text{muestra}})^{CP_{\text{muestra}}}$, donde RE es la expresión relativa, E es la eficiencia de los primers y CP el “crossing point”.

15. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático Graph Pad PRISM, utilizando el análisis Bonferroni post-test.

16. Aislamiento de ADN genómico

El aislamiento de ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo descrito en

(www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html).

17. Construcción de los minigenes UAS miR-284, UAS miR-304, UAS miR-306, sensor dRYBP y sensor dRYBP miR-7 mut.

La construcción de los minigenes UAS miR-284, UAS miR-304 y UAS miR-306, se realizó amplificando, mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), las regiones genómicas de los miR-284, miR-304 y miR-306 a partir de ADN genómico de moscas silvestres utilizando las parejas de oligos siguientes: miR-284F y miR-284R (para el miR-284) (Tabla 6); miR-304F y miR-304R (para el miR-304) (Tabla 6) y miR-306F y miR-306R (para el miR-306) (Tabla 6), que amplificaban fragmentos de 513, 559, y 356 pb (pares de bases) respectivamente. Estos fragmentos se clonaron independientemente en el vector pGem T easy (Promega) y se obtuvieron los vectores pGem miR-284, pGem miR-304 y pGem miR-306. Para la obtención del pUAS miR-284 Ds-Red, pUAS miR-304 Ds-Red y pUAS miR-306 Ds-Red, se cortó el vector pUAS-Ds-Red con Not I y en él se clonaron, por separado, los fragmentos resultantes de la restricción de los vectores pGem miR-284, pGem miR-304 y pGem miR-306 con Not I. Los vectores pUAS miR-284 Ds-Red, pUAS miR-304 Ds-Red y pUAS miR-306 Ds-Red fueron secuenciados para confirmar la orientación de los microRNAs dentro de los respectivos vectores. Las

Nombre	Forward	Reverse	Eficiencia
RpL32	GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG	AAACGCGGTTCTGCATGAG	1,891
dRYBP	CATGTTGACACCTGGCTCCTG	CGAAGGTGATCGAGGAGAAC	1,97
Dipt	GCTGCGCAATCGCTTCTACT	TGGTGGAGTGGGCTTCATG	1,9864
AttA	CCTACAACAATGCTGGTCATGGT	GGGCCTCCTGCTGGAAGA	2,03
Drs	CGTGAGAACCTTTTCCAATCTGATG	TCCAGGACCACCAGCAT	1,9908
Relish	TTAGCGTGGCCAACACAATG	GAAGTGCATGTGGAGTGCAT	1,98
PGRP-LC	GCATTCAATGGTGGTCCCA	CCGGATCTTCGTGTTTGAG	1,97
Imd	TTCGGCTCCGTCTACAACCTT	GTGATCGATTATGGCCTGGT	2,03
Dredd	CAAAAGGTGGGCCTCTGCT	GTAGGTGGCATCCGAGTGGT	2,02
Tab-2	TGTCATGGAGGAATGCGATC	GCTTCTGACGCTCGATAGTGG	1,97
TAK1	GATCTGAGTCCCAGCGAAAGC	CATCGCTCTTTCGTTCTGT	1,96
ird-5	TAGTGATCCATTGGCGAAACC	GCTTGGTGGCAATTTACAG	1,96
skpA	CTCCCGAGGAAATACGCAAG	CGGGCGAAAAGTCCTTCTTA	1,99
dIAP2	ATGCAAGGTATGCTTGACGA	TGATTGCAGGTGGCCAAGT	1,9

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados en la RT-qPCR.

reacciones de digestión, ligación y transformación fueron realizadas según protocolos estándar (Molecular Cloning Maniatis).

El minigen “sensor dRYBP” fue construido mediante la amplificación por PCR de la región 3’UTR del gen *dRYBP* a partir de ADN genómico de moscas silvestres. Se utilizaron los siguientes oligos 3’UTRF y 3’UTRR (Tabla 6) para obtener un fragmento de

1085 pb que fue clonado en el vector pGem-T Easy, dando lugar al vector pGem 3'UTR. A continuación el pGem 3'UTR, se cortó con la enzima de restricción Not I y el fragmento resultante de la digestión fue clonado en el vector pTub:EGFP, que fue previamente cortado con la enzima de restricción Not I, obteniéndose el vector pTub:EGFP:3'UTR, que lo denominamos "sensor dRYBP". El vector pTub:EGFP:3'UTR fue secuenciado para comprobar la orientación de la región 3'UTR. Del mismo modo que para la reacciones

Nombre	Forward	Reverse
miR-284	TTCCGCTTGGTTTGCGG	CCATATATGTAGGACCCTGGC
miR-304	GTTGTTGATCGCTGCTTCC	CGGAAACAGATCAGACAGC
miR-306	CTGGACACCTTGGCTATTTCGC	GCTAAAGCGCCAAAGCAATGGC
3'UTR	AGGAGGGGATACAAGGCCTCC	GTGTTGTCGTGTGAGTGCG
Df miR-7	CGTTAAAGCCCCGAAAAGCCAGGCCAAGATGGC	GCCATCTTGGCCTGGGCTTTTCGGGGCTTTAAACG

Tabla 6: Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de clonaje.

anteriores, las reacciones de digestión, ligación y transformación aquí realizadas fueron hechas según protocolos estándar (Molecular Cloning Maniatis).

El minigen "sensor dRYBP-miR7mut" fue construido mediante la eliminación de la región de unión del *microRNA-7* al 3'UTR del gen *dRYBP*. La pareja de oligos 3'UTRF y Df mir-7R (Tabla 6), fueron utilizados para amplificar una región de 183 pb y la pareja de oligos Df miR-7F y 3'UTRR (Tabla 6), se usó para amplificar una región de 100 5pb mediante PCR. A partir de estos fragmentos y los oligos 3'UTRF y 3'UTRR (Tabla 6), se amplificó un fragmento de 1188 pb en el que estaba delecionado el sitio de unión del miR-7 al 3'UTR de *dRYBP*. Este fragmento se clonó en el vector pGem obteniéndose el vector pGem 3'UTRdRYBP-miR7mut. Este vector se cortó con la enzima de restricción Not I y se clonó el vector pTub:EGFP, que fue previamente cortado con la enzima de restricción Not I obteniéndose el vector pTub:EGFP 3'UTR dRYBP-miR-7mut denominado sensor dRYBP miR-7mut. El vector pTub:EGFP:3'UTR dRYBP-miR-7mut fue secuenciado para comprobar la orientación de la región 3'UTR. Una vez más las reacciones de digestión, ligación y transformación fueron realizadas según protocolos estándar (Molecular Cloning Maniatis).

RESULTADOS

1. Función de la proteína dRYBP en el mantenimiento de la expresión génica

La proteína dRYBP (*Drosophila* Ring1B and YY1 Binding Protein), codificada por el gen *dRYBP*, y conservada filogenéticamente en la evolución, fue inicialmente catalogada como una proteína ETP, ya que se observó, por un lado que interaccionaba molecularmente tanto con proteínas PcG como con proteínas trxB (Gonzalez et al., 2008) y, por otro lado, que su actividad transcripcional era dependiente tanto de las proteínas PcG, como de las proteínas trxB (Bejarano et al., 2005) (Figura 12). Además, moscas conteniendo mutaciones en el gen *dRYBP* junto con mutaciones en los genes *PcG* o en genes *trxB* presentaban fenotipos homeóticos, indicando que el gen *dRYBP* interacciona genéticamente con genes de ambos grupos (Gonzalez et al., 2008). Estos resultados sugieren que los genes homeóticos pueden ser diana de acción de la proteína dRYBP.

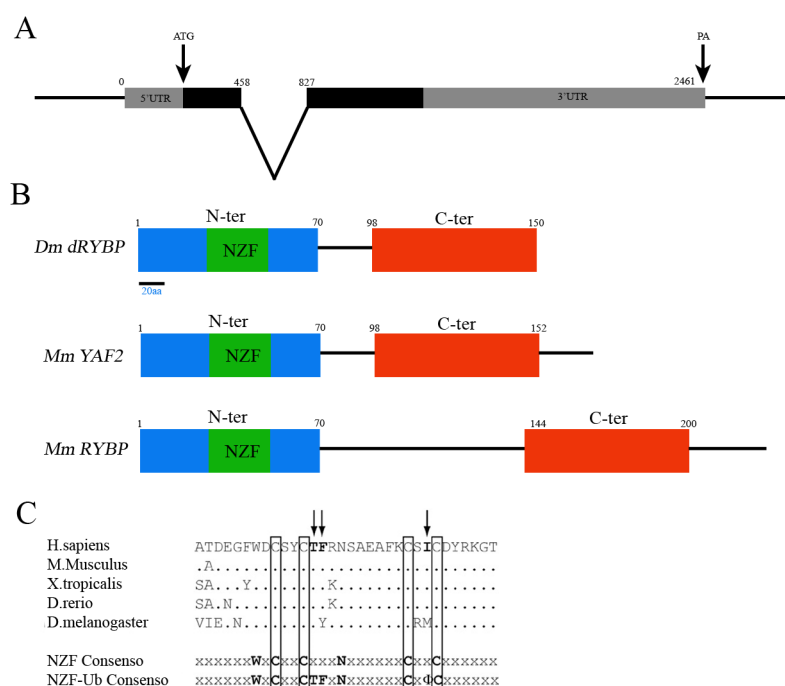


Figura 12. El gen y la proteína dRYBP. (A) Estructura del gen *dRYBP*. Se indican los exones (cajas negras), las regiones 5'UTR y 3'UTR (cajas grises) y el intrón (línea). (B) Esquema de las proteínas dRYBP de *Drosophila* y sus homólogos en ratón (RYBP Y YAF2). (C) Conservación del dominio Zinc Finger de la proteína dRYBP en distintas especies, las flechas indican el dominio de reconocimiento de la ubiquitina. Parte C modificada de (Arrigoni et al., 2006)

Para analizar con más profundidad si los genes homeóticos podrían estar regulados por la proteína dRYBP, se estudió si los embriones homocigóticos para mutaciones en el gen *dRYBP*, presentaban transformaciones homeóticas y desregulación de la expresión de las proteínas homeóticas Ultrabithorax (UBX) y Abdominal-B (ABD-B). Para ello, se realizaron los siguientes stocks: *dRYBP*¹/*CyOGFP*, *dRYBP*^{Δ55}/*CyOGFP* y *dRYBP*^{Δ16}/*CyOGFP* conteniendo mutaciones nulas para el gen *dRYBP* (Gonzalez et al.,

2008) y balanceadores que permiten seleccionar embriones homocigóticos para las mutaciones en estudio. Embriones homocigóticos para *dRYBP¹* no presentan ninguna alteración morfológica en el patrón de formación de los dentículos en el eje antero/posterior. Además, la expresión de las proteínas homeóticas UBX y ABD-B en estos embriones mutantes homocigóticos para *dRYBP¹* no estaba alterada, siendo muy similar, si no idéntica, a la expresión observada en embriones silvestres (Figura 13).

También se estudió si la expresión de las proteínas homeóticas UBX y ABD-B estaba alterada en embriones mutantes para el gen *dRYBP* junto con mutaciones en genes *PcG*. Para llevar a cabo este estudio se realizaron los siguientes stocks: *dRYBP¹/CyOGFP*; *Sce¹/MKRS* y *dRYBP¹/CyOGFP; Pc³/MKRS*, de los cuales se seleccionaron embriones homocigóticos para *dRYBP¹* y las mutaciones en estudio. Ninguna de estas combinaciones mutantes en el gen *dRYBP* y en genes de los grupos *PcG* y *trxG* resultaron en un aumento o disminución de los fenotipos asociados a mutaciones *PcG/trxG* (datos no mostrados) ni alteraron la expresión de las proteínas UBX y ABD-B (Figura

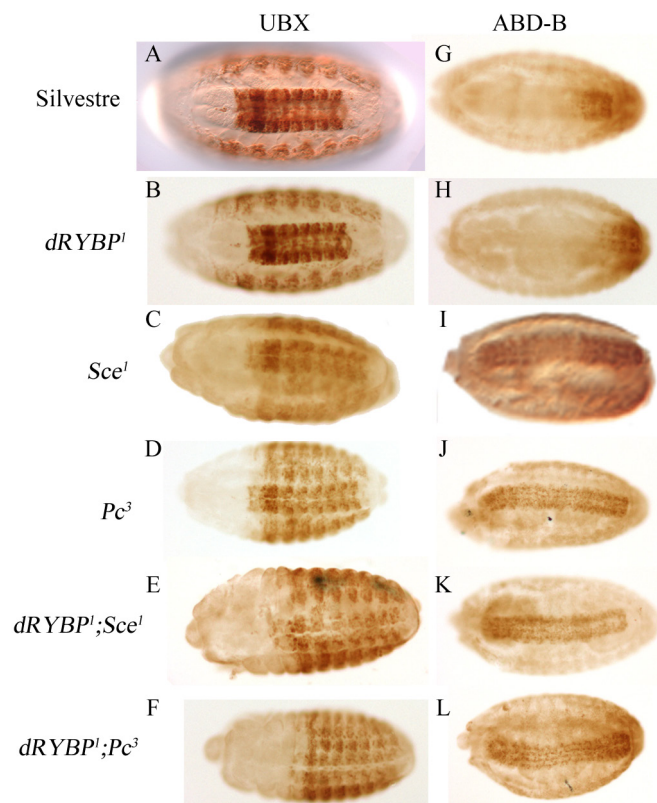


Figura 13. Expresión de las proteínas UBX y ABD-B en mutantes *dRYBP* y *PcG*. (A, B, C, D, E y F) Expresión de la proteína UBX en los genotipos indicados. (G, H, I, J, K y L) Expresión de la proteína ABD-B en los genotipos indicados. La des-represión observada de las proteínas ABD-B y UBX en mutantes *dRYBP¹;Pc³* y *dRYBP¹;Sce¹* se debe a la falta de función de las proteínas *PcG*. Obsérvese que la expresión de las proteínas ABD-B y UBX en embriones mutantes *dRYBP¹* es similar a la expresión observada en embriones silvestres.

13). Estos resultados podrían sugerir que la proteína *dRYBP* no interacciona con las proteínas de los grupos *PcG* aquí estudiadas. El elevado componente materno tanto de la proteína *dRYBP* (Bejarano et al., 2005), como de las proteínas *PcG* (Haynie, 1983; Mozer and Dawid, 1989), podría explicar que la expresión de UBX y de ABD-B no se encuentre alterada en embriones mutantes para *dRYBP* y *PcG*. Sin embargo, aunque no es probable, ya que se observaron fenotipos homeóticos en combinación con mutantes

PcG/trxG, también podría ser que la interacción entre el gen *dRYBP* y los genes *PcG* y *trxG* no fuera necesaria para la morfogénesis mediada por los genes homeóticos, pero si fuera necesaria para otras funciones biológicas en las que, las proteínas PcG/trxG y *dRYBP* estuvieran implicadas.

Los mecanismos de acción de las proteínas PcG y *trxG* requieren de la presencia, en sus genes diana, de elementos cis-reguladores, denominados PREs o TREs (Simon et al., 1993; Chang et al., 1995), necesarios para que los complejos proteicos, formados por proteínas PcG/trxG, reconozcan los genes diana que deben ser reprimidos o activados (revisado en (Schuettengruber et al., 2007; Schuettengruber et al., 2011)). Para analizar la función de *dRYBP* sobre estos elementos, se analizó el efecto de la falta de función de *dRYBP* sobre el mantenimiento de la expresión que ejerce el elemento MCP, un elemento PRE que mapea en el gen *Abd-B* (Busturia et al., 2001) y cuya función silenciadora de la transcripción es dependiente de las proteínas PcG/trxG (Busturia et al., 2001). Para ello se analizó si la expresión de la β -galactosidasa (β -gal), dirigida por la construcción MCP PBX UBxpp lacZ (Busturia et al., 2001), en los discos imaginales, se afectaba en ausencia del gen *dRYBP* (Figura 15). Para inactivar el gen *dRYBP* se utilizó

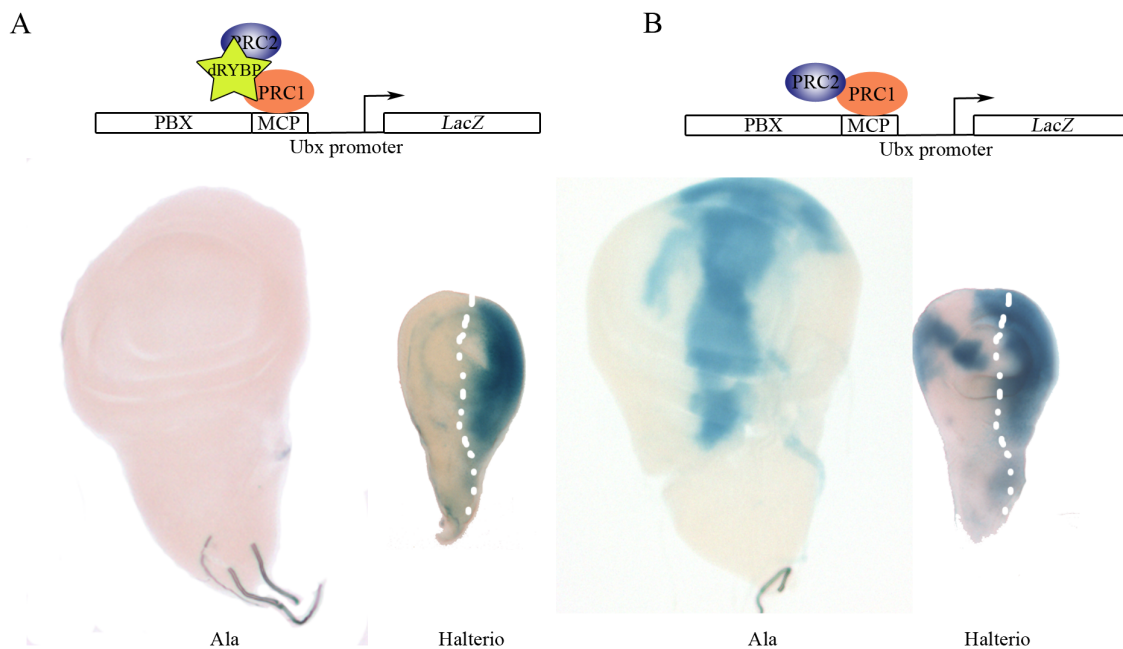


Figura 14. *dRYBP* regula el silenciamiento mediado por MCP, un elemento de respuesta a Polycomb (PRE). (A) Esquema de la construcción génica P[PBX-MCPubxppLacZ] que da lugar a la expresión de LacZ en los discos imaginales de ala y halterio. La expresión de lacZ está restringida a las células del compartimento posterior del disco de halterio debido a la acción silenciadora del elemento MCP donde se reclutan los complejos formados por proteínas Polycomb. En la parte inferior se muestran los discos imaginales de larvas P[PBX-MCPubxppLacZ] /+. (B) Expresión de lacZ en discos de ala de larvas *Sd>dRYBP_{RNAi}/+;P[PBX-MCPubxppLacZ]/+*. Nótese que la expresión del LacZ se des-reprime tanto en células del disco de halterio como en células del disco de ala.

el ARN interferente de *dRYBP* con la línea *sdGal4* que dirige la expresión en los discos imaginales de ala y halterio. Se estudió la expresión del β -gal en los discos imaginales de larvas *sd> dRYBP_{RNAi}; MCP PBX Ubxpp lacZ* y se comparó con la expresión de β -gal en discos imaginales de larvas *MCP PBX Ubxpp lacZ* (Figura 14). Como se observa en la Figura 14, la expresión del β -gal no se mantiene reprimida en ausencia de *dRYBP* indicando que *dRYBP* ejerce su función a través de las secuencias reguladoras PREs. Estos resultados indican, una vez más, que *dRYBP* está involucrado en la función del mantenimiento de la expresión génica de los genes homeóticos junto con las proteínas PcG/trxG y que ejerce su función a través de los PREs.

2. Estudio de la viabilidad a lo largo del desarrollo de mutantes en el gen *dRYBP* y sus fenotipos en la larva y en el individuo adulto

Para llevar a cabo el estudio de los fenotipos asociados a la falta de función del gen *dRYBP* se utilizaron tanto moscas que contenían las tres mutaciones mencionadas anteriormente como moscas transgénicas que contenían el ARN interferente del gen *dRYBP* (Gonzalez et al., 2008), que permite inactivarlo en un determinado órgano o tejido en un momento específico del desarrollo.

Para caracterizar los fenotipos producidos por la falta de función de *dRYBP* se realizó, en primer lugar, un estudio de la letalidad asociada a mutaciones nulas homocigóticas en el gen *dRYBP* a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Este estudio se llevó a cabo usando los siguientes stocks conteniendo las mutaciones de falta de función *dRYBP¹/CyOGFP*, *dRYBP^{Δ16}/CyOGFP* y *dRYBP^{Δ55}/CyOGFP*. Se seleccionaron aproximadamente unos 100 embriones homocigóticos mutantes para *dRYBP*, mediante la ausencia de GFP y se contabilizaron los individuos muertos y vivos en las distintas fases del desarrollo (Figura 15A). Como se observa en la Figura 15, el análisis de viabilidad de estos tres mutantes nulos indica que la falta de función de *dRYBP* produce letalidad en las distintas fases del desarrollo. El 24% de los individuos *dRYBP¹* llegan a la etapa adulta, en el caso de los mutantes *dRYBP^{Δ16}* y *dRYBP^{Δ55}* los individuos que llegan a la etapa adulta son el 25% y el 29% respectivamente. Cabe destacar, que en todos los casos, el desarrollo de las moscas mutantes para el gen *dRYBP* está retrasado, es decir, tardan aproximadamente entre 14 o 15 días en alcanzar la fase adulta en lugar de los 10 días que tarda un individuo normal.

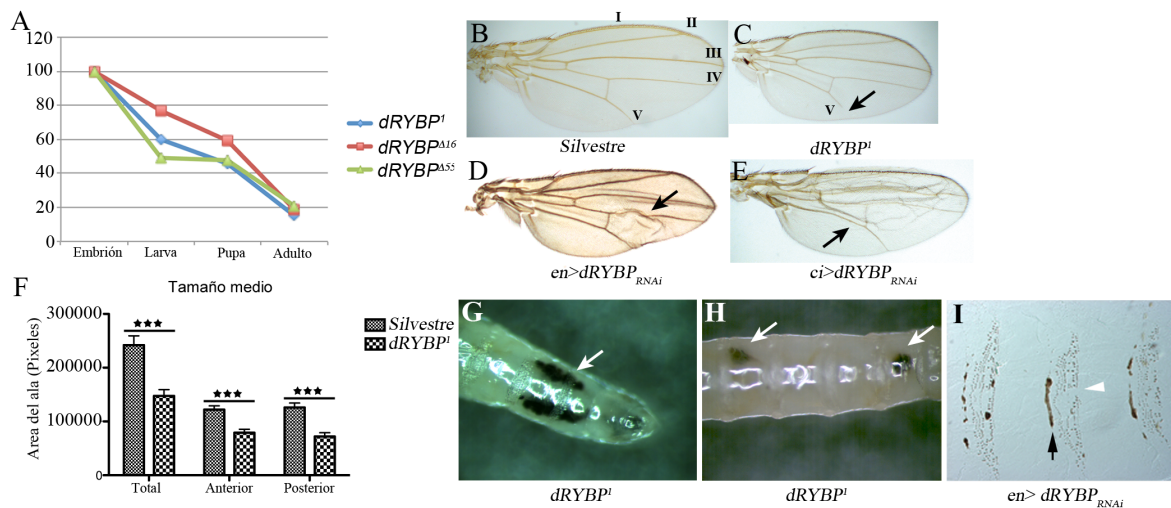


Figura 15. Fenotipos asociados a la falta de función de *dRYBP*. (A) Letalidad a lo largo del desarrollo asociada a las mutaciones *dRYBP¹*, *dRYBP^{Δ16}* y *dRYBP^{Δ55}*. (B) Ala de moscas silvestre. Los números romanos representan el número de la vena. (C) Ala de moscas *dRYBP¹*. Nótese la disminución del tamaño y la desaparición de parte de la vena V (flecha). (D) Ala *en>dRYBP^{RNAi}*. Obsérvese la aparición de una ampolla en la parte posterior del ala (flecha) y la disminución del tamaño. (E) Ala *ci>dRYBP^{RNAi}*. Nótese la aparición de una ampolla en la parte anterior del ala (flecha) y la disminución del tamaño del ala. (F) Cuantificación del efecto en el tamaño del ala de moscas *dRYBP¹*. (***) $p < 0,001$. (G) Tumor melanótico en las glándulas salivales de larvas *dRYBP¹* (flecha). (H) Larva *dRYBP¹* mostrando un tumor melanótico en la cutícula (flecha). (I) Tumor melanótico en larvas *en>dRYBP^{RNAi}* (flecha) y desorganización de los denticulos (cabeza de flecha).

Se observó que un bajo porcentaje de larvas homocigóticas para *dRYBP¹* presentaban tumores melanóticos en el intestino, la cutícula o la glándula salival (Figura 15G y H). Además, los tumores melanóticos también aparecían cuando la inactivación del gen *dRYBP* se llevaba a cabo mediante la sobre-expresión del ARN interferente; como se muestra en la Figura 15, donde larvas *en>dRYBP^{RNAi}* presentan tumores melanóticos en la región posterior de los segmentos, región en la cual la línea *enGal4* dirige la expresión. En la formación de tumores melanóticos pueden estar involucrados distintos procesos como son: la muerte celular, la hematopoyesis o la respuesta inmune (Lemaître et al., 1995b; Qiu et al., 1998; Takehana et al., 2002; Minakhina and Steward, 2006), por lo que la aparición de tumores melanóticos en ausencia de *dRYBP* sugiere que este gen puede estar implicado en la regulación de alguno de estos procesos durante el desarrollo de la mosca.

Por otro lado, el análisis de los fenotipos en los individuos adultos de moscas mutantes para *dRYBP* detectó una fuerte disminución en el tamaño del ala en los mutantes *dRYBP¹* llegando a alcanzar una reducción de aproximadamente un 27% (Figura 15 C y F). Además, las alas de estos individuos presentan fenotipos que son variables tanto en su penetrancia como en su expresividad como son el acortamiento de la vena V (21% de las moscas) y alas convexas. La falta de función de *dRYBP* también presenta

otros fenotipos como son la malformación de las patas en el 11% de los individuos y la aparición de dos o tres pelos en el sexto externito de los machos (5% de las moscas) (datos no mostrados) (Gonzalez et al., 2008).

Para estudiar los fenotipos producidos en el ala por el ARN interferente de *dRYBP* se inactivó su expresión utilizando diferentes líneas GAL4: 1) *sdGAL4* que se expresa en la región del disco imaginal de ala que va a dar lugar al ala propiamente dicha, 2) *enGal4*, que dirige la expresión en la parte posterior de los segmentos y 3) *ciGal4*, que dirige la expresión en la parte anterior de los segmentos. Las alas de las moscas *sd>dRYBP_{RNAi}* muestran una reducción del tamaño, así como el acortamiento de la vena V (dato no mostrado). Estos fenotipos observados en el ala con la inactivación del gen *dRYBP* usando el ARN interferente con la línea *sdGal4* son similares a los presentados por los mutantes del gen *dRYBP* en el ala (Figura 15B). Las alas de las moscas *en>dRYBP_{RNAi}* presentan fenotipos de acortamiento de la vena V, la aparición de tumores melanóticos, la formación de ampollas en el compartimento posterior y la disminución del tamaño de este compartimento (Figura 15D). Moscas *ci>dRYBP_{RNAi}* presenta formación de ampollas en la parte anterior del ala, como sucede en moscas *en>dRYBP_{RNAi}* (Figura 15E). La formación de ampollas en las alas adultas está relacionada con fallos en la aposición entre las superficies dorsales y ventrales del ala (Grabbe et al., 2004; Dominguez-Gimenez et al., 2007). Fallos en distintos procesos biológicos pueden derivar en la formación de ampollas en el ala tales como: fallos en la proliferación, apoptosis, o incluso en la hematopoyesis, debido a que los hemocitos son responsables de la secreción de proteínas de la matriz extracelular así como de la eliminación de sustancias de desecho y células apoptóticas que no formarán parte de la estructura adulta (Murray et al., 1995; Kiger et al., 2001).

3. Búsqueda de genes que interaccionan con el gen *dRYBP*

La aparición de ampollas asociada a la inactivación de *dRYBP* en las alas de las moscas *en>dRYBP_{RNAi}* es un fenotipo con alta expresividad y una penetrancia del 59%. Se diseñó un experimento para buscar genes

CG	Gen	% de ampollas
2368	pipsqueak	94,7
6502	Enhancer of Zeste	100
3886	Posterior sex combs	20
14941	extra sex combs	25
7958	tonalli	33,3
9495	Sex comb on midleg	53,8
3445	pleiohomeotic like	59,1
12190	dRYBP	59

Tabla 7: Genes *PcG/trxG* que fueron inactivados mediante la sobre-expresión de su ARN interferente y que modulan la penetrancia del fenotipo de falta de función de *dRYBP*.

que modulasen la penetrancia de este fenotipo. Para ello moscas *enGal4/CyO; UAS dRYBP_{RNAi}/ MKRS* se cruzaron con una colección de moscas transgénicas (Anexo 1), procedentes del VDRC (Vienna Drosophila RNAi Center) que contienen las secuencias UAS y el ARN interferente que permiten la inactivación del gen de estudio (Figura 16A) (Dietzl et al., 2007). La elección de moscas transgénicas conteniendo las construcciones UAS ARN interferente

CG	Gen	% de ampollas
CG5576	Imd	0
CG18492	TAK1	0
CG4432	PGRP-LC	0
CG7486	Dredd	2
CG1102	Melanization protease 1	7
CG12297	FADD	13
CG2078	Myd88	15
CG5974	pelle	20
CG8400	caspar	21
CG5680	bsk	23
CG14704	PGRP-LB	27
CG13422	CG13422	27
CG7417	Tab-2	33
CG11992	Rel	36
CG5370	Death caspase 1	40
CG4201	Ikk	59
12190	dRYBP	59
CG18106	Immune induced molecule 2	60
CG9169	FucTD	64
CG7228	Peste	67
CG7367	CG7367	67
CG4437	PGRP-LF	72
CG3066	Serine Protease 7	73
CG16705	Spatzle	76
CG12919	eiger	77
CG8846	thor	83
CG14746	PGRP-SC1a	100
CG14745	PGRP-SC2	100
CG11709	PGRP-SA	100
CG10363	Thiolester containing protein IV	100
CG7052	Thiolester containing protein II	100
CG7103	PDGF-VEGF related factor 1	100
CG13780	PDGF-VEGF related factor 2	100
cg7362	cg7362	100
cg7633	cg7633	100
CG8577	PGRP-SC1b	100

Tabla 8: Genes del sistema hematopoyético y de la respuesta inmune que fueron inactivados mediante la sobre-expresión del ARN interferente y que modulan la penetrancia del fenotipo de falta de función de *dRYBP*.

se realizó en base a los resultados de ChIP on chip (Gonzalez et al., en preparación) y teniendo en cuenta los fenotipos asociados a la falta de función de *dRYBP* (Figura 15) (Gonzalez et al., 2008).

Por ello se seleccionaron moscas transgénicas conteniendo las construcciones necesarias para inactivar: 1) genes de los grupos *PcG/trxG*, 2) genes relacionados con los procesos de apoptosis, 3) genes involucrados en la hematopoyesis y por último, 4) genes involucrados en la respuesta inmune de *Drosophila* (Anexo 1). Se cruzaron mos-

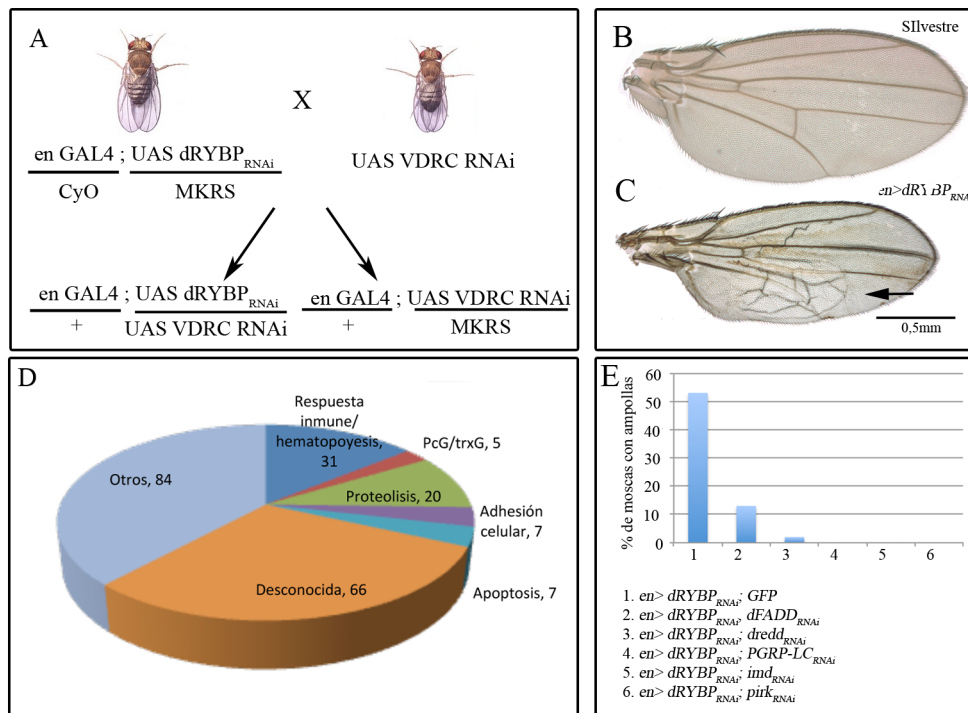


Figura 16. Búsqueda de genes moduladores del fenotipo producido por la inactivación de dRYBP en el ala. (A) Esquema de los cruces. (B) Ala silvestre. (C) Ala *en>dRYBP_{RNAi}*, obsérvese la formación de ampollas en el ala *en>dRYBP_{RNAi}* (Flecha). (D) Representación esquemática de los genes moduladores de la formación de ampolla.

cas *enGal4/CyO*; *UAS dRYBP_{RNAi}* / *MKRS* con moscas conteniendo los ARN interferentes de los genes en estudio (Figura 16A) y se analizó la penetrancia de la aparición de ampollas en los individuos adultos resultantes. Además en el mismo cruce se analizaron los efectos de la inactivación del gen de estudio, mediante el ARN interferente. De los 578 genes analizados 246 fueron letales al inactivarlos con la línea *enGAL4* (Anexo 1). De los 578 genes estudiados 186 modularon la penetrancia del fenotipo en estudio, bien aumentando o disminuyendo el porcentaje de ampollas producido por la falta de función del gen *dRYBP* (Anexo 1). El análisis de estos resultados indica, por un lado, que de los 21 genes pertenecientes al PcG y *trxG* incluidos en esta búsqueda, 14 eran letales cuando se inactivaban con la línea *enGAL4*, dos de ellos *pho-l* (*pleiohomeotic-like*) y *Scm* (*Sex comb on midleg*) no modulan el fenotipo de ampolla producido por *dRYBP*, dos de ellos *psq* (*pipsqueak*) y *E(z)* (*Enhancer of zeste*) aumentan la penetrancia de las ampollas y tres de ellos *Psc* (*Posterior sex comb*), *tonalli* y *Esc* (*Extra sex comb*) disminuyen la penetrancia (Tabla 7). Por otro lado, esta búsqueda también indica que *dRYBP* puede estar actuando en la respuesta inmune o el sistema hematopoyético, ya que de los 589 genes estudiados en esta búsqueda 38 estaban relacionados con la respuesta inmune o la hematopoyesis. De estos genes, 15 aumentaban la penetrancia de ampollas, 16 disminuían la penetrancia, mientras que 7 no tenían ningún efecto (Tabla 8). Los re-

sultados aquí mostrados indican que el gen *dRYBP* interacciona con un gran número de genes lo que sugiere que está regulando un gran número de procesos biológicos a lo largo del desarrollo de *Drosophila*.

4. Función del gen *dRYBP* y de las proteínas PcG en la hematopoyesis

Se decidió explorar la función de *dRYBP* y de las proteínas PcG en la hematopoyesis principalmente por dos razones. En primer lugar, los fenotipos de tumores melanóticos y de ampollas asociados a la falta de función de *dRYBP* (Figura 15), pueden ser debidos a fallos en el sistema hematopoyético, y en segundo, en la búsqueda de genes, que modulasen la penetrancia del fenotipo de ampolla en el ala asociado a la falta de función de *dRYBP*, se encontraron genes como *Notch* y *Eiger* que están involucrados en el desarrollo del sistema hematopoyético (Tabla 8) (Mandal et al., 2004; Bidla et al., 2007). La generación de los tumores melanóticos no esta muy bien asociada a un proceso biológico concreto. En algunos casos se ha descrito que la aparición de tumores melanóticos está asociada a fallos en el sistema hematopoyético (Minakhina and Steward, 2006), a fallos en la respuesta inmune (Qiu et al., 1998; Takehana et al., 2002) o bien a fallos en procesos apoptóticos (Minakhina and Steward, 2006). La formación de tumores melanóticos se produce por la liberación al medio de la enzima pro-fenoloxidasa, que cataliza el proceso de melanización que tiene lugar durante el proceso de cicatrización, para reparar la rotura del epitelio de la larva o el individuo adulto (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Las “Crystal cells”, son las células responsables de este proceso, aunque se ha visto que las células apoptóticas también pueden liberar pro-fenoloxidasa (Minakhina and Steward, 2006). Los tumores melanóticos han sido clasificados como dependientes de hemocitos, al ser éstos uno de los principales responsables de los procesos que ocurren durante la melanización,

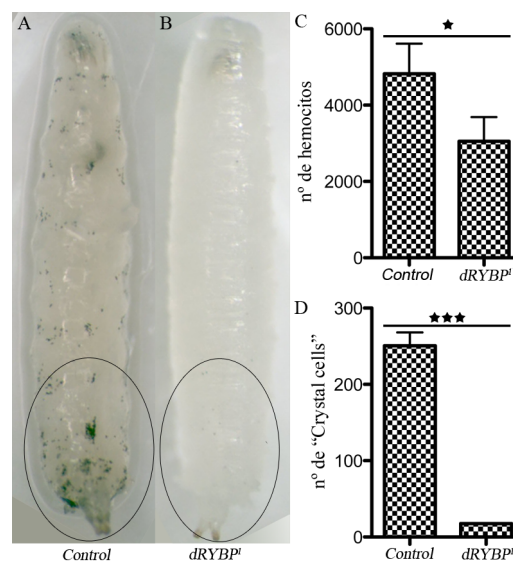


Figura 17. La falta de función de *dRYBP* produce disminución del número de “Crystal cells” y de los hemocitos totales. (A) Larva silvestre mostrando las “Crystal cells”. El círculo indica las “Crystal cells” de la zona posterior de la larva. **(B)** Larvas *dRYBP¹* mostrando las “Crystal cells”. Nótese la fuerte disminución del número de “Crystal cells” (Círculo). **(C)** Cuantificación del número de hemocitos totales mediante FACS en las larvas control y larvas *dRYBP¹* (* $P < 0.05$). **(D)** Cuantificación del número de “Crystal cells” en larvas silvestre y *dRYBP¹* (*** $p < 0.001$).

o independientes de hemocitos (Minakhina and Steward, 2006). Los tumores que son dependiente de hemocitos, reclutan hemocitos durante su formación y se especula que posiblemente su formación sea debida a un fallo en el sistema hematopoyético de la larva, al producirse fallos en los procesos de diferenciación o proliferación de los hemocitos (Minakhina and Steward, 2006). En cambio, los tumores que no dependen de los hemocitos pueden ser producidos por apoptosis o bien a fallos en la respuesta inmune, que en último termino produce la activación de la fenoloxidasa y por lo tanto la formación de tumores melanóticos (Lemaitre et al., 1995b; Qiu et al., 1998; Lavine and Strand, 2002; Takehana et al., 2002).

Para investigar la función de *dRYBP* en la hematopoyesis, se analizó si la mutación nula para *dRYBP*¹ presentaba un mayor o menor número de “Crystal Cells” en larvas de tercer estadio. Como se muestra en la Figura 17 la falta de función del gen *dRYBP* presenta una disminución en el número de “Crystal Cells” de aproximadamente un 90% en comparación con larvas control (Figura 17C). Esta disminución en el número de “Crystal cells” sugiere que el gen *dRYBP* es necesario para el correcto desarrollo de los hemocitos. Debido a que se observó un efecto en el número de “Crystal cells”, se cuantificó el número de hemocitos totales por análisis de citometría de flujo en la hemolinfa de larvas mutantes *dRYBP*¹, *HisIII*GFP y de larvas control *HisIII*GFP. Los resultados indican que larvas *dRYBP*¹, *HisIII*GFP presentan un 26% menos de hemocitos totales que larvas *HisIII*GFP (Figura 17B). Estos resultados sugieren que el gen *dRYBP* es necesario para la proliferación de hemocitos o bien que en su ausencia se produce una disminución de hemocitos debido a la apoptosis.

Para analizar si la formación de los tumores melanóticos en larvas mutantes para *dRYBP* era dependiente de hemocitos, se diseccionaron larvas *dRYBP*¹ homocigóticas que presentaban tumores y se tiñeron con el anticuerpo anti-Hemese. La proteína Hemese

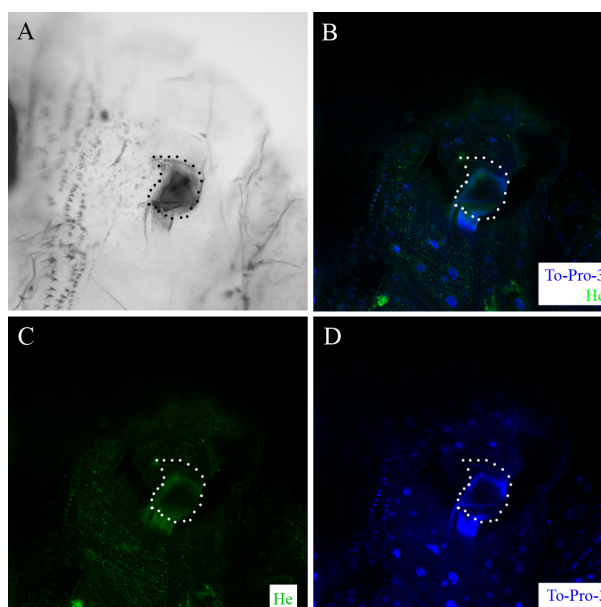


Figura 18. Los tumores melanóticos producidos por la falta de función de *dRYBP* no reclutan hemocitos. (A) Tumor melanótico (línea punteada) en la cutícula de una larva *dRYBP*¹ (línea punteada). (B) Superposición de las imágenes C y D. (C) Expresión de Hemese (He). (D) Expresión de To-Pro-3.

(Kurucz et al., 2003), se expresa en todos los hemocitos de *Drosophila* al igual que en la glándula linfática. Como se observa en la Figura 18, los tumores producidos por la falta de función del gen *dRYBP* no reclutan hemocitos. Este resultado indica que los tumores producidos por la falta de función de *dRYBP* son debidos a otros procesos biológicos durante el desarrollo de la larva.

Los resultados mostrados anteriormente (Figura 15 y Tabla 8), sugieren que *dRYBP* tiene una función en el sistema hematopoyético, ya que, la falta de función de *dRYBP* produce una disminución en el número de hemocitos y de “Crystal cells”, lo que puede ser debido a fallos en proliferación o procesos apoptóticos en la generación de las células hematopoyéticas.

Debido a que se había demostrado previamente que la proteína *dRYBP* interactuaba con las proteínas del grupo Polycomb (Gonzalez et al., 2008), se estudió si las proteínas PH (Polyhomeotic), PHO (Pleiohomeotic), SCE (Sex Comb Extra), Su(Z)12 (Suppressor of zeste (12)) y ESC (Extra Sex Comb) tenían un efecto en la hematopoyesis. Para ello se estudió el efecto de la inactivación de la expresión de estas proteínas en

el sistema hematopoyético de *Drosophila*. Para llevar a cabo la inactivación de estas proteínas se sobre-expresó el ARN interferente de dichos genes con la línea *He-meseGal4* (*HeGal4*), que se expresa en la glándula linfática y en los hemocitos circulantes. Larvas *He>Sce_{RNAi}*, *He>Su(z)12_{RNAi}*, *He>esc_{RNAi}*

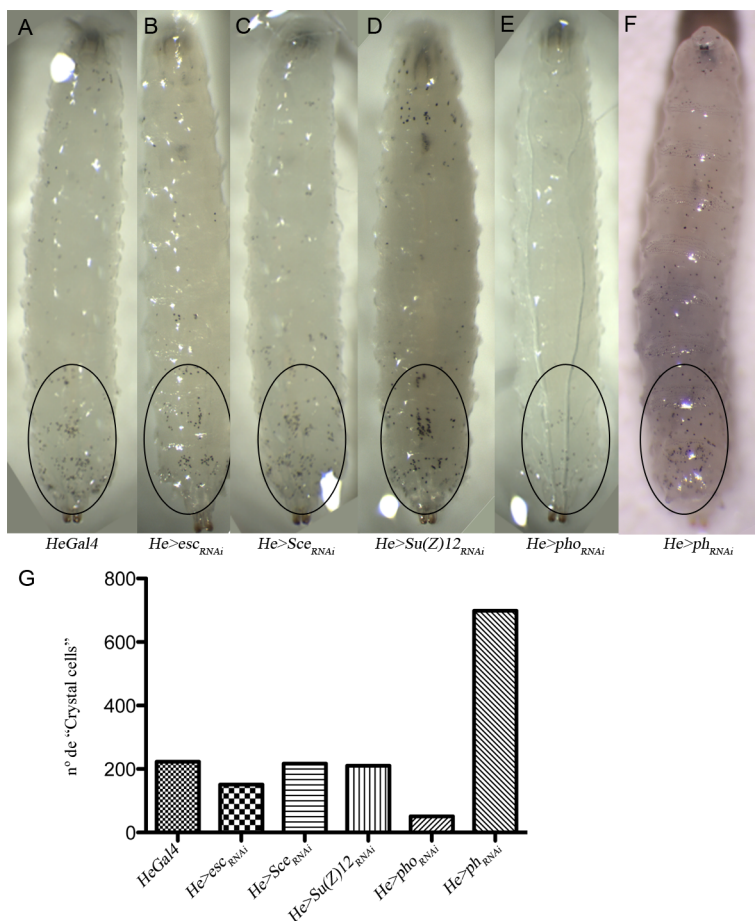


Figura 19. Efecto de la inactivación de genes del grupo Polycomb en el número de "Crystal cells". (A) Larva *HeGal4* mostrando las "Crystal cells" (flecha). (B) Larva *He>esc_{RNAi}*. (C) Larva *He>Sce_{RNAi}*. (D) Larva *He>Su(Z)12_{RNAi}*. (E) Larva *He>pho_{RNAi}* y (F) Larva *He>ph_{RNAi}*. Las flechas indican las "Crystal cells". (G) Cuantificación relativa del número de "Crystal cells" en larvas de los genotipos indicados.

contenían un número de “Crystal cells” circulantes equivalentes a las larvas control (Figura 19A, B, C, D y G). Sin embargo, la inactivación de *pho* en larvas *He> pho_{RNAi}* produce una disminución significativa del número de “Crystal cells”, respecto a larvas control (Figura 19A, E y G). Por otro lado, larvas *He> ph_{RNAi}* muestran un aumento en el número de “Crystal cells” respecto a larvas control (Figura 19A, F y G). Estos resultados indican que las proteínas PH y PHO, ambas del grupo PcG, tienen un papel en el desarrollo del sistema hematopoyético, y más concretamente, en el proceso de diferenciación desde hemocitos a “Crystal cells” o en el proceso de proliferación que tiene lugar durante el desarrollo de la larva.

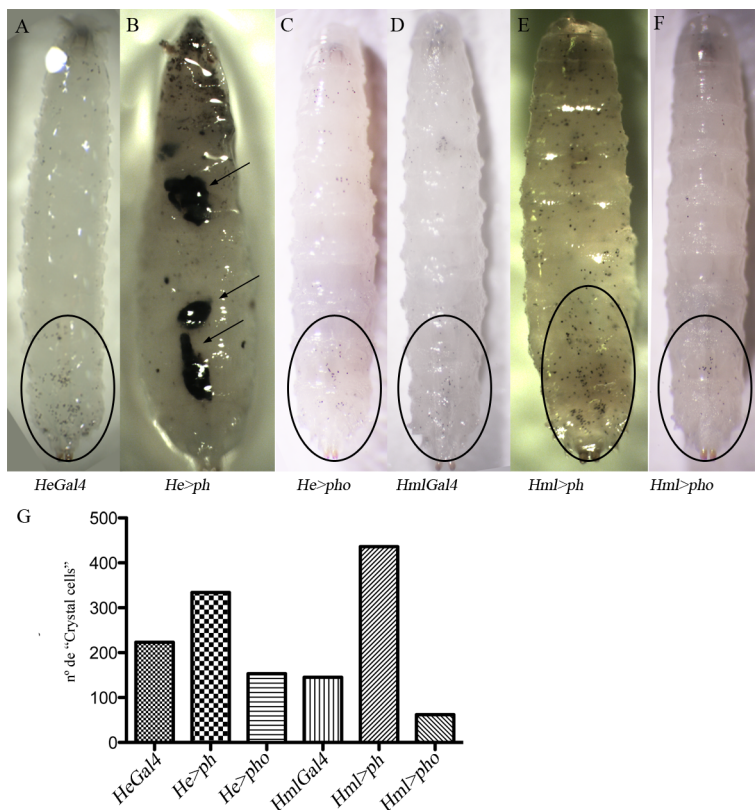


Figura 20. Efecto de la sobre-expresión de proteínas PcG en el número de “Crystal cells”. (A) Larva HeGal4, (B) Larva He>ph, nótese los tumores melanóticos (flechas), (C) Larva He>pho, (D) Larva HmlGal4, (E) Larva Hml>pho y (F) Larva Hml>ph. (G) Cuantificación relativa del número de “Crystal cells” en larvas de los genotipos indicados.

También, se analizó si altos niveles de las proteínas PH y PHO, ambas del grupo PcG, presentaban algún efecto en el sistema hematopoyético. Para ello se sobre-expresaron los cDNAs de dichas proteínas con las líneas heGal4, que se expresa

en los hemocitos circulantes y en la glándula linfática y *HemolectinaGal4* (*HmlGal4*) (Goto et al., 2003), que se expresa solo en los hemocitos circulantes. Larvas *He>pho* o *Hml>pho* no producen ningún efecto en el número de “Crystal cells” (Figura 20 C y G), pero larvas *He>ph* presentan un aumento de las mismas (Figura 20 B y G). Además, larvas *He>ph* también presentan tumores melanóticos en la hemolinfa de la larva (Figura 20B). Al igual que en el caso del gen *dRYBP*, se determinó si en la formación de estos tumores estaban implicadas las células hematopoyéticas, para lo cual se realizó una tinción de estos tumores con el anticuerpo anti-Hemese y anti-Croquemort, que marcan hemocitos. Como se observa en la Figura 21, los tumores melanóticos de estas larvas reclutan hemocitos, indicando que en la formación de estos tumores están invo-

lucrados los hemocitos. Larvas *Hml> ph* muestran un aumento del número de “Crystal cells” (Figura 20 E y G) pero, al contrario de lo que sucede cuando se sobre-expresa la proteína PH con la línea *HeGal4* no se observa formación de tumores melanóticos en la hemolinfa de *Drosophila*. Los resultados aquí presentados indican que la formación de los tumores producidos por la sobre-expresión de la proteína PH son dependientes de hemocitos, y que en la formación de estos tumores está implicada la glándula linfática, ya que cuando se sobre-expresa únicamente en los hemocitos circulantes no se observa la aparición de este tipo de tumores. Además, estos resultados nos indican que altos niveles de expresión de la proteína PH inducen proliferación de las “Crystal cells”, lo que podría sugerir que altos niveles de PH inducen proliferación de hemocitos.

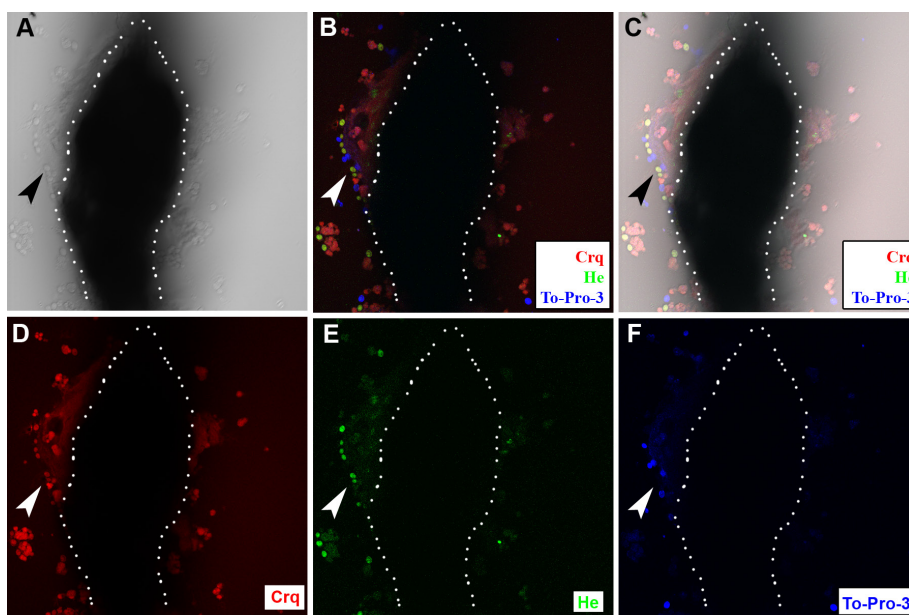


Figura 21. Los tumores melanóticos producidos por la sobre-expresión de PH reclutan hemocitos. (A) Tumor melanótico (línea punteada) en larvas *He> ph*. (B) Superposición de las imágenes D, E y F. (C) Superposición de las imágenes A y B. (D) Expresión de Croquemort (Crq) (cabeza de flecha). (E) Expresión de Hemese (He). Nótese la expresión de He en las células que rodean al tumor (cabeza de flecha). (F) Expresión de To-Pro-3.

Por tanto, estos resultados indican que los genes *PcG* tienen una función importante en la hematopoyesis de *Drosophila*. La falta de función de la proteína PH y sus altos niveles inducen la proliferación de hemocitos, indicado por el elevado número de “Crystal cells” (Figura 19 y 20), tanto a nivel de la glándula linfática como en los hemocitos circulantes, sugiriendo que el gen *ph* presenta una función durante el desarrollo del sistema hematopoyético de *Drosophila*. Además, la falta de función del gen *pho* y del gen *dRYBP* presentan una disminución en el número de “Crystal cells” (Figura 17 y 19). Por otro lado, los tumores melanóticos producidos por la falta de función de *dRYBP* no reclutan hemocitos (Figura 18), por lo que podrían ser debidos a fallos en la apoptosis

o en la respuesta inmune, que se estudia a continuación.

5. Función del gen *dRYBP* en la respuesta inmune

5.1 El gen *dRYBP* se expresa en los tejidos inmuno competentes de la mosca

Se investigó, en primer lugar, la expresión de la proteína dRYBP en los tejidos inmuno competentes de *Drosophila*, es decir, en el tejido graso, las tráqueas, el intestino y los túbulos de Malpighi (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Para ello, se diseccionaron estos tejidos de larvas *y¹, Df(1)^{w67c23}* de tercer estadio y se realizó una tinción con el anti-cuerpo anti-dRYBP (Gonzalez et al., 2008). Como se observa en la Figura 22 la proteína dRYBP se expresa nuclearmente en las células del tejido graso, principal órgano productor de péptidos antimicrobianos frente a infecciones bacterianas. Además, dRYBP también se expresa en el intestino (Figura 22B y C), tanto en los enteroblastos como en los enterocitos. Por ultimo, también se observa expresión de dRYBP en las tráqueas (Figura 23D) y en los túbulos de Malpighi (Figura 22E). Esta expresión de dRYBP en estos tejidos sugiere que *dRYBP* pueda estar actuando en la respuesta inmune de la mosca.

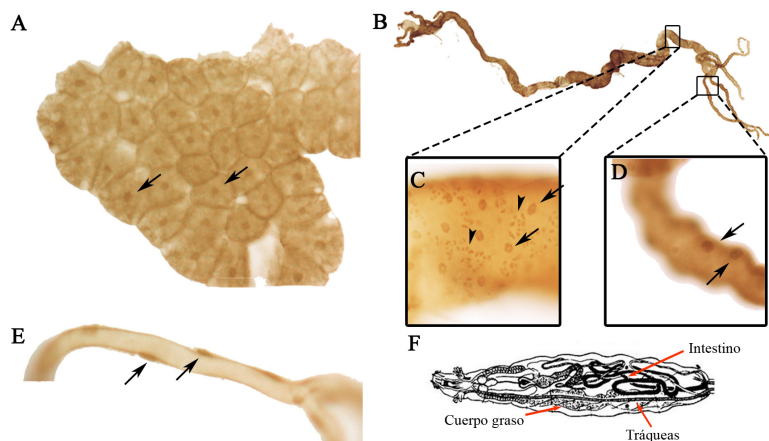


Figura 22. Expresión de dRYBP en los tejidos inmuno-competentes de *Drosophila*. (A) Expresión de la proteína dRYBP en el núcleo (flechas) de las células del cuerpo graso. (B) Expresión de la proteína dRYBP en el intestino. (C) Ampliación del intestino para mostrar que dRYBP se expresa nuclearmente en los enterocitos (flechas) y en los enteroblastos (cabeza de flechas). (D) Ampliación de los túbulos de malpighi. Expresión de dRYBP en los núcleos de las células de los túbulos de malpighi (Flechas). (E) Expresión de la proteína dRYBP en los núcleos de las células de las tráqueas (flechas). (F) Representación esquemática de la localización de los tejidos inmuno-competentes en la larva de *Drosophila*.

5.2 El gen *dRYBP* no regula la respuesta inmune controlada por la ruta de Toll

La respuesta inmune en *Drosophila* está regulada tanto por la ruta de Toll como por la ruta de Imd (ver introducción, Figura 6 de la introducción) (Lemaitre and Hoffmann, 2007), cuya activación depende del tipo de agente infeccioso que esté promoviendo la expresión diferencial

de péptidos antimicrobianos. Por ejemplo, la activación de la ruta de Toll induce, entre otros, la expresión del péptido antimicrobiano Drosomicina (Drs) (Fehlbaum et al., 1994), mientras que la activación de la ruta de Imd induce la expresión, por ejemplo, del péptido an-

timicrobiano Diptericina (Dpt) (Wicker et al., 1990). La ruta de Toll se activa cuando existe una infección producida por bacterias Gram-positivas (Belvin and Anderson, 1996; Tauszig-Delamasure et al., 2002), mientras que, si la infección es producida por bacterias Gram-negativas la ruta que se activa es la ruta de Imd (Lemaitre et al., 1995a).

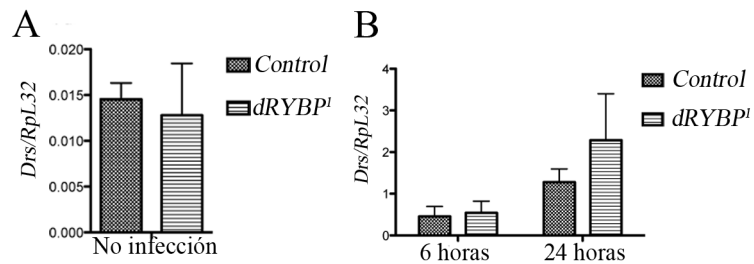


Figura 23. La falta de función de *dRYBP* no afecta la ruta de Toll. (A) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de Drosomicina en moscas *Ore-R* (control) y *dRYBP¹* sin infectar. (B) Cuantificación mediante qRT-PCR de los niveles de Drosomicina en moscas infectadas con *M.luteus* a 6 y 24 hr después de la infección en moscas *Ore-R* (control) y *dRYBP¹*.

Para estudiar si *dRYBP* estaba involucrado en la regulación de la respuesta inmune se infectaron moscas mutantes para *dRYBP* con bacterias Gram-positivas, que activan la vía de Toll, y se estudiaron los niveles de expresión de Drs, uno de los AMPs cuyos niveles de expresión aumentan en respuesta a infecciones producidas por estas bacterias. Se infectaron hembras adultas homocigóticas para la mutación *dRYBP¹* mediante el pinchazo en el tórax con una aguja conteniendo bacterias Gram-positiva *Micrococcus luteus* (*M.luteus*), y mediante RT-qPCR se analizaron los niveles de expresión de Drs a tiempo 0 y transcurridas 8 y 24 horas después de la infección. Como se muestra en la Figura 23, los niveles de expresión de Drs no se ven alterados en moscas *dRYBP¹* respecto a moscas control. Estos resultados indican que el gen *dRYBP* no está implicado en la respuesta inmune frente a infecciones producidas por bacterias Gram-positivas y por tanto que *dRYBP* no está involucrado en la regulación de la ruta de señalización de Toll.

5.3 El gen *dRYBP* regula la respuesta inmune controlada por la ruta Imd

Se estudió si la falta de función de *dRYBP* regula la producción de los péptidos antimicrobianos inducidos por la activación de la ruta de Imd como es Dpt. Los niveles de expresión de Dpt se analizaron mediante RT-qPCR en hembras adultas mutantes homocigóticas para *dRYBP¹* y *dRYBP^{Δ55}* infectadas mediante un pinchazo en el tórax

con una aguja conteniendo bacterias Gram-negativa *Erwinia corotovora corotovora* 15 *rif^R* (*Ecc15*). Se analizaron los niveles de expresión de Dpt a tiempo 0 y transcurridas 8 y 24 horas después de la infección. Como se observa en la Figura 24, la falta de función del gen *dRYBP* produce un aumento en la expresión de Dpt transcurridas 8 horas desde la infección, lo que indica que el gen *dRYBP* actúa como un regulador negativo de la expresión de Dpt y, por tanto, de la ruta de Imd.

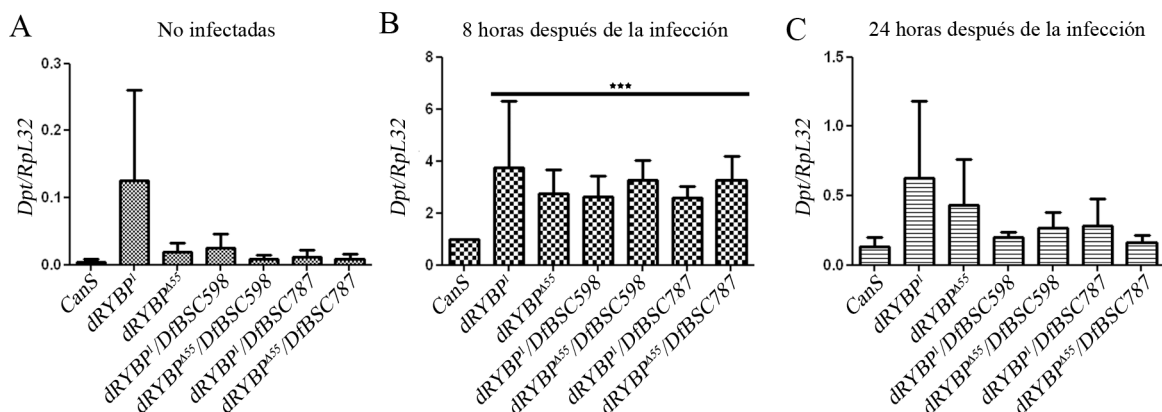


Figura 24. La falta de función de *dRYBP* activa la expresión de Diptericina en moscas adultas infectadas. (A) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de Dpt en moscas sin infectar de los genotipos indicados. *Canton S* se utilizó como moscas control. (B) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de Dpt en moscas de los genotipos indicados después de 8 horas de la infección con bacterias *Ecc15*. Obsérvese que existe un aumento significativo entre los niveles de expresión de Dpt en moscas silvestres y moscas mutantes para *dRYBP*. (***) $p < 0.001$. (C) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de Dpt en moscas de los genotipos indicados después de 24 horas de la infección con bacterias *Ecc15*. En este caso la variación no es significativa.

Para descartar que la disminución observada en los niveles de expresión de Dpt fueran debidos a modificadores contenidos en los cromosomas de los mutantes *dRYBP*¹ y *dRYBP*^{Δ55}, se estudiaron los niveles de expresión de Dpt en moscas adultas utilizando las deficiencias genómicas *Df BSC 787* y *Df BSC 598*, que eliminan el gen *dRYBP*. Para ello moscas *dRYBP*¹/*Df BSC*787, *dRYBP*¹/*Df BSC* 598, *dRYBP*^{Δ55}/*Df BSC* 787 y *dRYBP*^{Δ55}/*BSC* 598 fueron infectadas con bacterias *Ecc15* y los niveles de expresión de Dpt fueron medidos por RT-qPCR a tiempo 0 y transcurridas 8 y 24 horas desde la infección. Como se puede observar en la Figura 24, la infección producida en las moscas *dRYBP*¹/*Df BSC*787, *dRYBP*¹/*Df BSC* 598, *dRYBP*^{Δ55}/*Df BSC* 787 y *dRYBP*^{Δ55}/*Df BSC* 598 inducen un aumento en la expresión del péptido antimicrobiano Dpt a las 8 horas de infección, indicando, nuevamente, que el gen *dRYBP* está involucrado en la represión de la respuesta inmune.

A continuación, para comprobar si el gen *dRYBP* estaba regulando la respuesta inmune que se induce en el intestino debido a las infecciones orales, se alimentaron

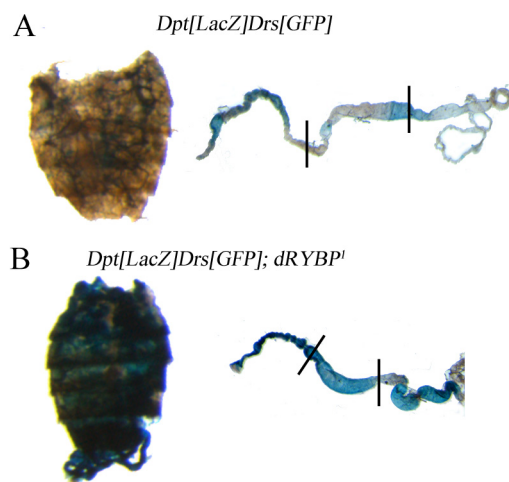


Figura 25. La falta de función de dRYBP activa la ruta de Imd en moscas adultas infectadas oralmente. (A) Expresión silvestre de la *DptLacZ* en el cuerpo graso y el intestino de moscas *DptLacZ,DrsGFP* infectadas con la bacteria *Ecc15* por vía oral. **(B)** Expresión de la *DptLacZ* en el cuerpo graso y el intestino de moscas *DptLacZ,DrsGFP; dRYBP¹* infectadas con la bacteria *Ecc15* por vía oral. Nótese la inducción de la expresión de LacZ debido a la falta de función de dRYBP.

moscas adultas (ver materiales y métodos) con bacterias *Ecc15*. Este tipo de infección induce una respuesta inmune en el intestino, pero, no induce la respuesta inmune en el tejido graso como sucede cuando la infección es producida por rotura del epitelio (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Para este estudio, se utilizaron moscas transgénicas que contenían la construcción *DptlacZ,DrsGFP* (Leulier et al., 2002), que permite monitorizar la expresión de Dpt mediante el análisis de la expresión del gen reportero LacZ. Moscas adultas *DptLacZ,DrsGFP*, utilizadas como control, y moscas adultas *DptLacZ,DrsGFP; dRYBP¹* fueron alimentadas con bacterias *Ecc15*. Transcurridas 15 horas desde la infección, se diseccionaron para proceder a la tinción del cuerpo graso y del intestino con X-gal. Como se muestra en la Figura 25, la infección oral en adultos control no induce la expresión del β -gal en el cuerpo graso de la mosca. Sin embargo, la falta de función de *dRYBP* induce una fuerte expresión de Dpt tanto en el cuerpo graso como en el intestino (Figura 25). Estos resultados indican que *dRYBP* reprime la expresión de los péptidos antimicrobianos en respuesta a infecciones orales. Además, cuando las moscas mutantes para *dRYBP* se infectan oralmente, se produce expresión de Dpt en el cuerpo graso, que no se observa en individuos control. Este resultado puede sugerir que, de alguna forma, la falta de función del gen *dRYBP* afecta la integridad del epitelio del intestino, permitiendo a las bacterias atravesar la barrera epitelial que separa el intestino de la hemolinfa, explicando por lo tanto, el aumento del reportero LacZ en el cuerpo graso de mutantes *dRYBP* infectados por vía oral (Wu et al., 2012).

5.4 Altos niveles de la proteína dRYBP inhiben la respuesta inmune

Debido a que la falta de función del gen *dRYBP* induce la expresión de Dpt, se quiso determinar si altos niveles de la proteína dRYBP eran capaces de inhibir la expresión de la misma. Para ello, se infectaron, mediante pinchazo en el tórax, moscas *Hs> dRYBP*

con la bacteria *Ecc15* y se sometieron a un choque térmico a 37°C durante 1 hora y se analizó la expresión de Dpt a distintos tiempos desde la infección (0, 8 y 24 horas).

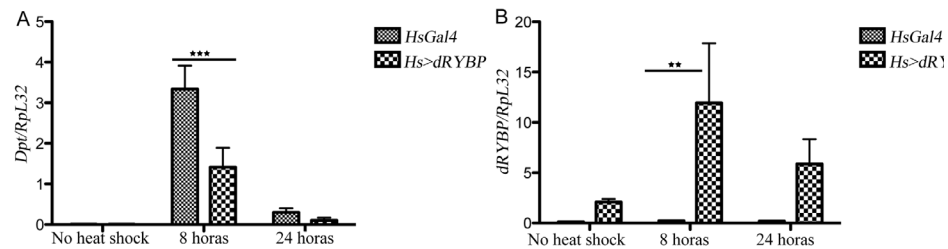


Figura 26. La sobre-expresión de dRYBP reprime la expresión de Diptericina (Dpt) en moscas infectadas. (A) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de Dpt. Niveles de expresión de Dpt en moscas de los genotipos indicados sin infectar, a las 8 y a las 24 horas después de la infección con *Ecc15*. Nótese la diferencia de expresión de Diptericina a las 8 horas entre moscas *HsGal4* y *Hs>dRYBP*. (***) $p < 0.001$. **(B)** Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de dRYBP en moscas de los genotipos indicados sin infectar y a las 8 y 24 horas después de la infección con *Ecc15*. Nótese la diferencia de expresión de dRYBP a las 8 horas entre moscas *HsGal4* y *Hs>dRYBP*. (***) $p < 0.005$.

La sobre-expresión de la proteína dRYBP, produce una disminución en la expresión de Dpt transcurridas 8 horas desde la infección (Figura 26). Estos resultados, junto con el análisis de expresión de Dpt en falta de función del gen *dRYBP*, indican que *dRYBP* es necesario para reprimir la respuesta inmune producida por bacterias Gram-negativas.

5.5 Los niveles de expresión de *dRYBP* influyen en la supervivencia de moscas infectadas con bacterias Gram-negativas

Los resultados aquí mostrados indican que el gen *dRYBP* actúa como regulador negativo de la vía de Imd, por lo que se estudió si la falta de función del mismo era necesaria para la supervivencia de las moscas en condiciones de infección. Para ello, se inactivó la expresión de *dRYBP* en el cuerpo graso de las moscas, mediante la expresión del ARN interferente con la línea *C564Gal4*, que dirige la expresión exclusivamente en el cuerpo graso de larvas y adultos (Zaidman-Remy et al., 2006). Los descendientes del cruce entre hembras *C564Gal4;tubGal80* con machos *UAS dRYBP^{RNAi}* se mantuvieron a 17°C hasta que se obtuvieron los individuos adultos. Las hembras *C564>dRYBPRNAi;tubGal80ts* resultantes del cruce anterior fueron mantenidas a 29°C durante 4 días para favorecer la expresión del ARN interferente y, pasado este tiempo, fueron infectadas mediante pinchazo en el tórax, con bacterias *Ecc15* y mantenidas a 29°C durante 200 horas adicionales en las que se contó su viabilidad. Hembras *C564>dRYBPRNAi;tubGal80ts* infectadas con la misma bacteria y mantenidas a 18°C fueron utilizadas como control. Se estudió la viabilidad de las moscas deficientes para *dRYBP* en comparación con moscas control durante 8 días. Como se observa en la gráfi-

ca de la Figura 27, la inactivación del gen *dRYBP* en el cuerpo graso produce un aumento en la letalidad de las moscas a lo largo de su vida, indicando que *dRYBP* se requiere para la supervivencia de *Drosophila* en condiciones de infección.

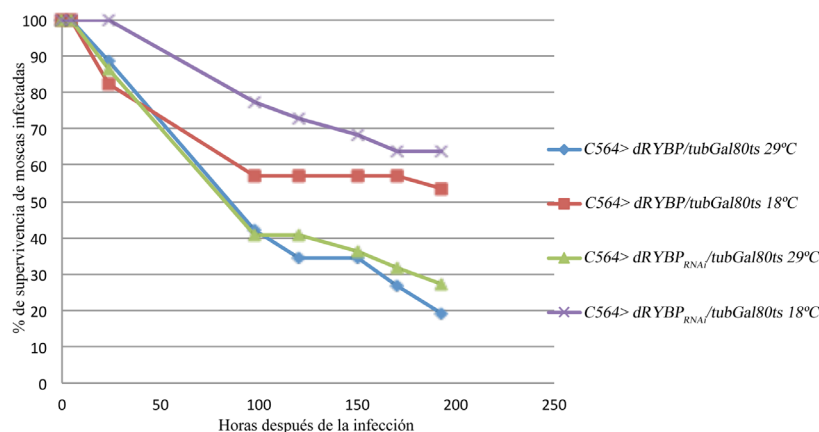


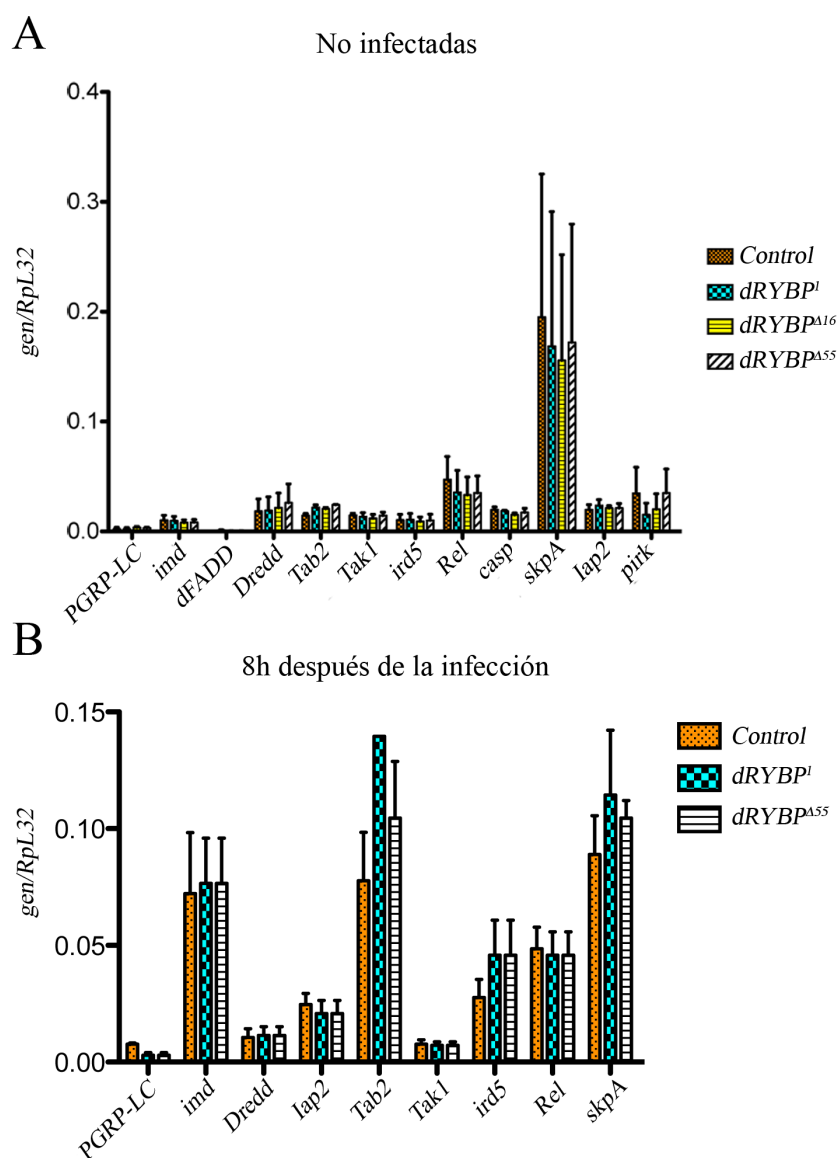
Figura 27. La falta de función de dRYBP y la sobre-expresión de dRYBP hacen que las moscas sean más susceptibles a infecciones bacterianas. La gráfica muestra el porcentaje de supervivencia de moscas durante 200 horas de vida después de la infección con bacterias *Ecc15*. Para estudiar los efectos de sobre-expresión de dRYBP. La comparación de la supervivencia se realizó entre moscas infectadas *C564>dRYBP;tubGal80ts* mantenidas a 18°C (rojo) y *C564>dRYBP;tubGal80ts* a 29°C (azul). Para estudiar los efectos de inactivación de dRYBP. La comparación de la supervivencia se realizó entre moscas infectadas *C564>dRYBPRNAi;tubGal80ts* mantenidas a 18°C (morado) y *C564>dRYBPRNAi;tubGal80* a 29°C (verde).

Debido a que la sobre-expresión de la proteína dRYBP reprime la expresión de Dpt, también se estudió si altos niveles de dRYBP tenían un efecto en la supervivencia de las moscas cuando éstas son infectadas. Embriones *C564>dRYBP;tubGal80ts*, provenientes del cruce entre hembras *C564Gal4;tubGal80ts* con machos *UASdRYBP* fueron desarrollados a 18°C. Los adultos resultantes fueron expuestos a 29°C durante 4 días para favorecer la sobre-expresión de dRYBP, y a continuación fueron infectados, mediante pinchazo en el tórax, con bacterias *Ecc15*, y mantenidas a 29°C durante 200 horas adicionales en las que se contó su viabilidad. Moscas *C564>dRYBP;tubGal80ts* desarrolladas a 18°C e infectadas con la bacteria *Ecc15* fueron utilizadas como control. Al igual que sucede en moscas en las que se ha inactivado *dRYBP* en el cuerpo graso, moscas con altos niveles de dRYBP en el cuerpo graso presentan un mayor índice de mortalidad cuando se comparan con moscas control (Figura 27).

Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de dRYBP son importantes para la supervivencia de las moscas en condiciones de infección. Ya que, tanto la falta de función como la sobre-expresión de dRYBP influyen en la supervivencia de las moscas y por tanto hacen que las moscas sean más susceptibles frente a infecciones producidas por bacterias Gram-negativas.

5.6 Estudio de los mecanismos de regulación de la actividad de la vía IMD mediada por dRYBP

Como primera aproximación para el estudio de la función de *dRYBP* en la regulación de la ruta de Imd, se estudió si *dRYBP* regula los niveles de expresión de los genes de la cascada de Imd (Figura 8 de la introducción). Para ello, se analizaron, mediante RT-qPCR, los niveles de expresión de los genes involucrados en la ruta de Imd de larvas homocigóticas mutantes para el gen *dRYBP* usando las mutaciones *dRYBP*¹, *dRYBP*^{Δ16} y *dRYBP*^{Δ55}.



Como se muestra en la Figura 28 ninguno de los genes de la cascada de Imd presentan un aumento, o una disminución significativa en su expresión en ausencia de *dRYBP*.

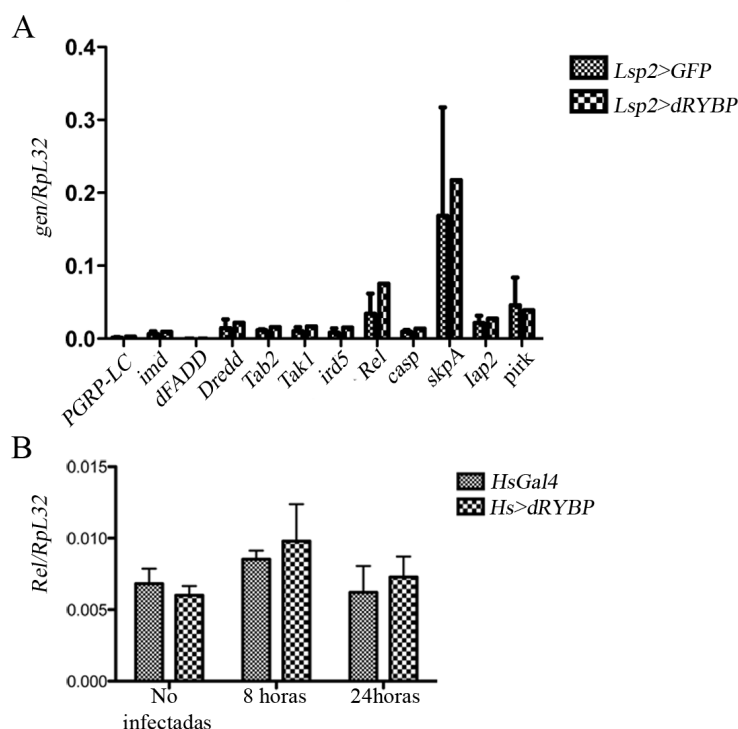
Figura 28. La falta de función de *dRYBP* no modifica la expresión de los genes componentes de la ruta de Imd. (A) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de los genes de la ruta de Imd indicados en el eje de abscisas, en larvas *y¹Df(1)w67c23*, *dRYBP*¹, *dRYBP*^{Δ16} y *dRYBP*^{Δ55}. (B) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de los genes de la ruta de Imd indicados en el eje de abscisas, en moscas adultas *Can S*, *dRYBP*¹ y *dRYBP*^{Δ55}, después de 8 horas de la infección.

Por otro lado, también se analizó si la falta de función del gen *dRYBP* en moscas infectadas afectaba la expresión de los genes de la ruta de Imd. Para inactivar la función de *dRYBP* se utilizaron los mutantes *dRYBP*¹ y *dRYBP*^{Δ55}. Hembras homocigóticas para

las mutaciones *dRYBP*¹ y *dRYBP*^{Δ55} fueron infectadas mediante un pinchazo en el tórax con la bacteria *Ecc15*. Los niveles de expresión de los genes de la ruta de Imd se analizaron mediante RT-qPCR a las 0 y a las 8h desde la infección. Los resultados aquí mostrados indican que la falta de función del gen *dRYBP* no afecta la expresión de los genes de la ruta de Imd aquí analizados (Figura 28). Estos datos sugieren que el gen *dRYBP* no regula transcripcionalmente los niveles de expresión de los genes que forman parte de la ruta de Imd en condiciones de infección.

También, se estudió si los niveles de expresión de los genes de la ruta de Imd estaban afectados por altos niveles de la proteína dRYBP. Para ello se sobre-expresó la proteína dRYBP con la línea *Lsp2GAL4* (Lazareva et al., 2007), que se expresa en el cuerpo graso, y se analizaron por RT-qPCR los niveles de expresión de los genes que forman parte de la ruta de Imd. Como se observa en la gráfica de la Figura 29, no existe una variación significativa en los niveles de expresión de los genes que intervienen en la activación de la ruta Imd.

Debido a que los niveles de expresión de *Rel* están aumentados en infección (De Gregorio et al., 2001), se analizó si altos niveles de la proteína dRYBP estaban afectando los niveles de expresión de *Rel*. Para ello, se sobre-expresó la proteína dRYBP usando moscas conteniendo la construcción *HsGal4*. Moscas *Hs>dRYBP* no infectadas e infectadas con la bacteria *Ecc15* se sometieron a un choque térmico a 37 °C durante 1 hora.



A continuación, se analizaron los niveles de expresión de *Rel*, mediante RT-qPCR, a las 0, 8 y 24 horas después de la infección. Como se puede ver en la Figura 29, altos niveles

Figura 29. La sobre-expresión de dRYBP no modifica la expresión de los genes componentes de la ruta de Imd. (A) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de los genes de la ruta de Imd indicados en el eje de abscisas, en larvas *Lsp2> GFP* y *Lsp2> dRYBP* no infectadas. **(B)** Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de *Rel* en moscas *HsGal4* y *Hs> dRYBP* no infectadas y a las 8 y 24 horas después de la infección.

de la proteína dRYBP en moscas infectadas no alteran los niveles de expresión de *Rel* respecto a moscas control, indicando que dRYBP no regula los niveles de expresión de *Rel* en moscas infectadas. Los resultados aquí mostrados indican que el gen *dRYBP* no regula transcripcionalmente a los genes de la ruta de Imd.

5.7 Análisis epistático de la función de *dRYBP* en la ruta de Imd

Como se ha mostrado anteriormente, los resultados indican que *dRYBP* es un regulador negativo de la ruta de Imd cuando se produce una infección (Figura 24, 25 y 26). Para determinar a que nivel de la cascada de Imd se requiere la función de dRYBP, se sobre-expresó la proteína dRYBP junto con distintas proteínas que activan la ruta.

Para analizar si dRYBP funciona “upstream” o “downstream” de la proteína IMD, moscas *Hs>imd*; *dRYBP* y moscas *Hs>imd* fueron sometidas a un choque térmico durante 1 hora a 37°C, y a continuación se analizaron los niveles de expresión de Dpt a las 24 horas. Los niveles de expresión de Dpt (Figura 30A), en moscas en las que se ha sobre-expresado dRYBP, son menores que en moscas en los que dRYBP no ha sido sobre-expresado sugiriendo que dRYBP actúa o bien junto con IMD o bien “downstream” IMD

para inhibir la respuesta inmune. Para comprobar que la disminución en los niveles de expresión de Dpt no fueran debidos a una dilución de la proteína GAL4, se analizaron los niveles de ex-

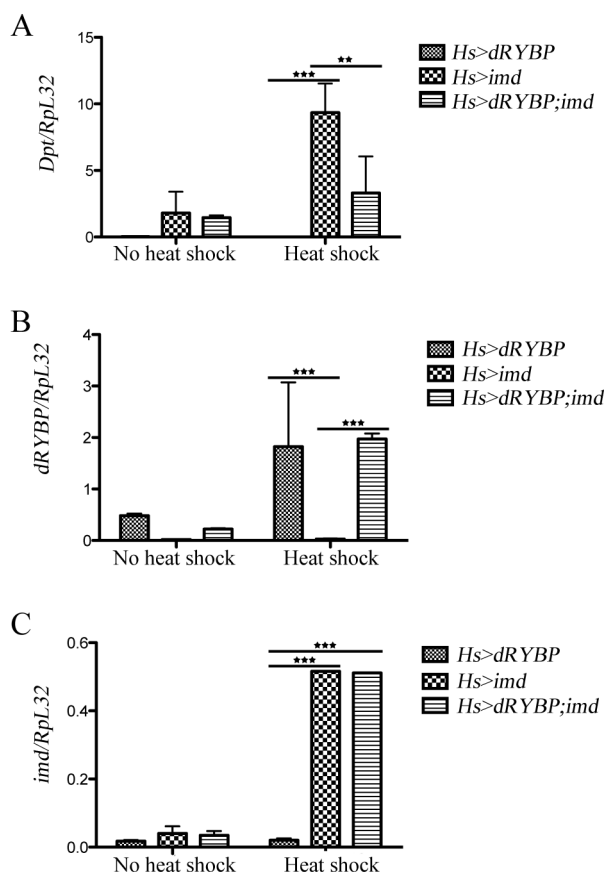


Figura 30. dRYBP actúa “downstream” o junto con Imd para reprimir la respuesta inmune.

(A) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de Dpt en moscas *Hs> dRYBP*, *Hs> imd* y *Hs> dRYBP; imd* con o sin choque térmico. Obsérvese la disminución en la expresión de Dpt en moscas *Hs> dRYBP; imd* respecto a moscas *Hs> imd*. (**p<0.001 y **p<0.005). **(B)** Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de dRYBP en moscas *Hs>dRYBP*, *Hs> imd* y *Hs> dRYBP; imd* con o sin choque térmico. Obsérvese que no existe dilución (debido a la expresión concomitante de dos proteínas con el mismo GAL4), en la expresión de dRYBP entre moscas *Hs> dRYBP* y *Hs> dRYBP; imd*. (**p<0.001) **(C)** Cuantificación mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de imd en moscas *Hs> dRYBP*, *Hs> imd* y *Hs> dRYBP;imd* con o sin choque térmico. Nótese que no existe dilución de la expresión de dRYBP ni de imd entre moscas *Hs>imd* y *Hs>dRYBP;imd*. (**p<0.001).

presión de *dRYBP* e *imd* en las mismas condiciones. Como se muestra en la Figura 30, los niveles de expresión de estos genes no se ven afectados cuando se comparan con la sobre-expresión de los mismos por separado, sugiriendo que la disminución en los niveles de expresión de Dpt en moscas *Hs> imd;dRYBP* versus *Hs> imd* son debidos a la sobre-expresión de la proteína dRYBP.

También, se analizó si altos niveles de la proteína dRYBP inhibían la respuesta inmune cuando ésta era activada por las proteínas Bendless (Ben, Figura 31) (Zhou et al., 2005) y Effete (Eff, Figura 32) (Paquette et al., 2010). En primer lugar, se analizaron si altos niveles de estas proteínas aumentaban los niveles de expresión de Dpt. Para ello moscas *Hs> Ben* y moscas *Hs> Eff* se sometieron a un choque térmico durante 1 hora a 37°C y se analizaron los niveles de expresión de Dpt a las 8 horas. La sobre-expresión de la proteína Bendless induce un aumento en la expresión de Dpt (Figura 31). Sin embargo, la sobre-expresión de la proteína Effete no produce una variación significativa en los niveles de expresión de Dpt (Figura 32). Ya que los altos niveles de Bendless inducen un aumento en la expresión de Dpt, pero no los altos niveles de Effete, se estudió si la sobre-expresión de dRYBP tenía un efecto en la respuesta inmune inducida por altos niveles de Bendless. Para ello, moscas *Hs>Ben; dRYBP* se sometieron a un choque térmico durante 1 hora a 37°C y se analizaron los niveles de expresión de Dpt a las 8 horas desde la inducción de la sobre-expresión. Los resultados indican (Figura 31A) que la sobre-expresión conjunta de dRYBP y Ben disminuye los niveles de expresión de Dpt en comparación con moscas en las que solo se había sobre-expresado Ben (Figura 31A). Estos resultados sugieren que dRYBP actúa junto con Ben o “downstream” Ben para inhibir la expresión de Dpt.

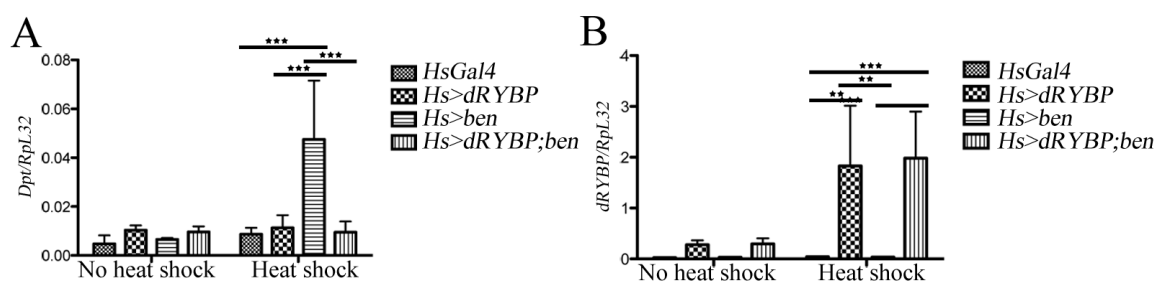


Figura 31. dRYBP actúa “downstream” o junto con Bendless para reprimir la respuesta inmune. (A) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de Dpt en moscas *HsGal4*, *Hs> dRYBP*, *Hs> ben* y *Hs> dRYBP; ben* con o sin choque térmico. Obsérvese la disminución en la expresión de Dpt en moscas *Hs> dRYBP; ben* respecto a moscas *Hs> ben*. (***) $p < 0.001$. **(B)** Cuantificación mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de dRYBP en moscas *HsGal4*, *Hs> dRYBP*, *Hs> ben* y *Hs> dRYBP; ben* con o sin choque térmico. Nótese que no existe dilución en la expresión de dRYBP entre moscas *Hs> dRYBP* y *Hs> dRYBP; ben*. (***) $p < 0.001$ y ** $p < 0.005$).

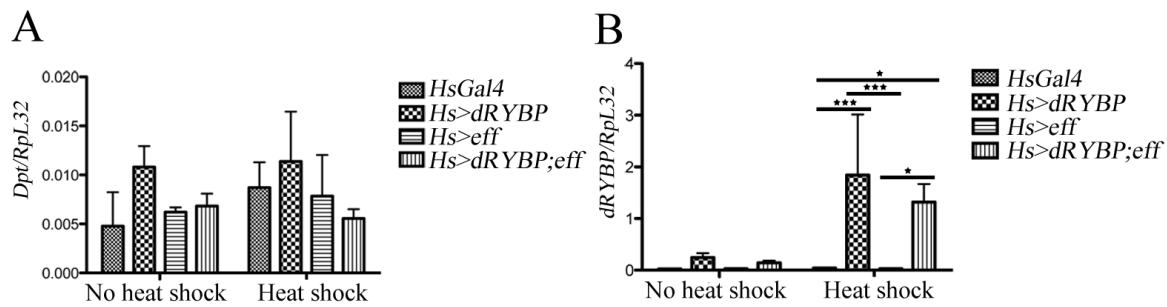


Figura 32. La sobre-expresión de Effete no induce la respuesta inmune. (A) Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de Dpt en moscas *HsGal4*, *Hs>dRYBP*, *Hs>eff* y *Hs>dRYBP;eff* con o sin choque térmico. Nótese que la sobre-expresión de effete no induce la expresión de Dpt. **(B)** Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de dRYBP en moscas *HsGal4*, *Hs>dRYBP*, *Hs>eff* y *Hs>dRYBP;eff* con o sin choque térmico. Nótese que no existe dilución en la expresión de dRYBP entre moscas *Hs>dRYBP* y *Hs>dRYBP;eff*. (** $p < 0.001$ y * $p < 0.01$).

También se analizó si la sobre-expresión de la proteína dRYBP inhibía la expresión de Dpt cuando se sobre-expresa la proteína Relish (Hedengren et al., 1999). Para sobre-expresar la proteína Relish se utilizó la construcción UAS RelishHH que activa la respuesta inmune (Hedengren et al., 1999). Moscas *Hs>RelHH* y *Hs>dRYBP* presentan una expresión constitutiva a 17°C, por lo que se estudió si dRYBP inhibía la expresión de Dpt a 17°C en moscas *Hs>dRYBP;RelHH*. La Figura 33, muestra que los niveles de expresión de Dpt están disminuidos cuando se sobre-expresa Rel junto con dRYBP. Este resultado, indica que dRYBP actúa o bien junto, o bien “downstream” Rel para inhibir los niveles de Dpt.

El análisis epistático que se ha presentado hasta el momento con los activadores de la ruta de Imd: IMD, Ben y Rel, indica que dRYBP actúa junto o “downstream” IMD, Ben y Rel para inhibir la ruta de Imd (Figura 30, 31 y 33).

Por último, también, se analizó si dRYBP interaccionaba con los reguladores negativos de la vía, como por ejemplo SKPA (Khush et al., 2002) (Figura 8 de la introducción), para inhibir la ruta.

Para ello, se analizó si la disminución de la expresión de Dpt inducida por altos niveles de dRYBP se modificaba en ausencia de SKPA. En este caso se utilizó el ARN interfer-

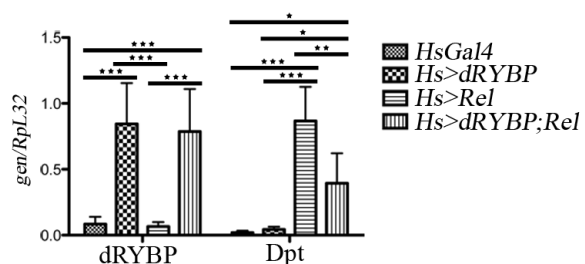
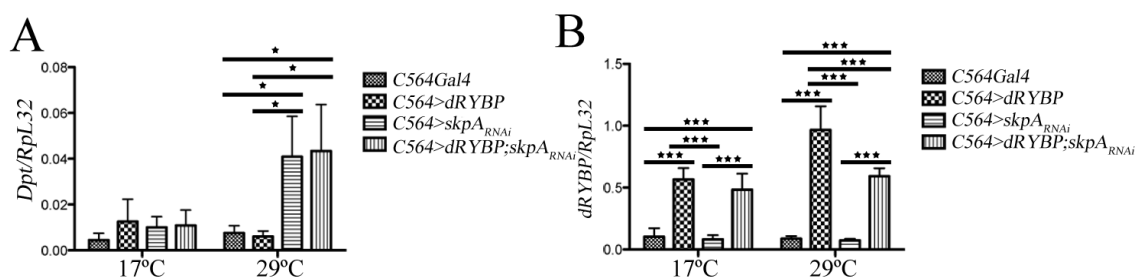


Figura 33. dRYBP actúa “downstream” o junto a Relish para reprimir la respuesta inmune. Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de dRYBP y Dpt en moscas *HsGal4*, *Hs>dRYBP*, *Hs>Rel* y *Hs>dRYBP;Rel* crecidas a 17°C. Obsérvese que dRYBP se expresa significativamente a 17°C y que la sobre-expresión de dRYBP junto con Rel disminuye la expresión de Dpt respecto a moscas en las que únicamente se sobre-expresa Rel. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

ente de *skpA* para inhibir su función. Moscas *C564>skpA_{RNAi}* y moscas *C564>skpA_{RNAi}; dRYBP* se expusieron a 29°C durante 24 horas, analizándose la expresión de Dpt transcurrido este tiempo. Como ya se había descrito (Khush et al., 2002) y como se muestra en la Figura 34 la falta de función de *skpA* produce un aumento en la expresión de Dpt ya que, este es un regulador negativo de la vía. Sin embargo, los altos niveles de dRYBP no son capaces de modificar la expresión de Diptericina causada por la ausencia de *skpA* (Figura 34). Este resultado indica que dRYBP actúa “upstream” o junto con SKPA para inhibir la expresión de la respuesta inmune.



Los resultados aquí mostrados indican que la proteína dRYBP actúa o bien junto con IMD, Ben o Rel o bien “downstream” IMD, Ben o Rel para inhibir la respuesta inmune. Estos resultados, también, indican que dRYBP puede estar actuando junto con SKPA o “upstream” para inhibir la respuesta inmune.

5.8 Localización celular de la proteína dRYBP en condiciones de infección

Como se ha mostrado previamente la expresión de dRYBP es fundamentalmente nuclear en los tejidos inmuno-competentes (Figura 22). Sin embargo, los resultados presentados hasta el momento, sugieren que dRYBP interacciona con proteínas citoplasmáticas para regular la activación de la ruta de Imd. Por tanto, se estudió si, en condiciones de infección, se producía una traslocación de la proteína dRYBP desde el núcleo al citoplasma para poder ejercer su función como regulador negativo de la respuesta inmune. Para ello, se generaron moscas transgénicas que contenían las secuencias UAS y la proteína recombinante YFP:dRYBP (plásmido cedido por la Dra Ne-

yen, EPFL, Lausana, Suiza) que se utilizaron para la detección de la expresión de la proteína dRYBP. La proteína YFP:dRYBP se sobreexpresó utilizando la línea C564 que dirige la expresión en el cuerpo graso (Zaidman-Remy et al., 2006). Moscas *C564> YFP:dRYBP* se infectaron con la bacteria *Ecc15* y se estudió la expresión antes y después de la infección. Como se muestra en la Figura 35, la expresión de la proteína de fusión YFP:dRYBP presenta una expresión nuclear tanto en el cuerpo graso de moscas que no han sido infectadas como en el cuerpo graso de moscas que han sido infectadas con bacterias *Ecc15* mediante pinchazo en el tórax. La falta de expresión de la proteína recombinante YFP:dRYBP en el citoplasma puede ser debido a varias razones, bien que la proteína dRYBP no se trasloque al citoplasma en condiciones de infección o bien que la proteína dRYBP se exprese a niveles muy bajos en el citoplasma y por lo tanto, no puedan ser detectados con este método.

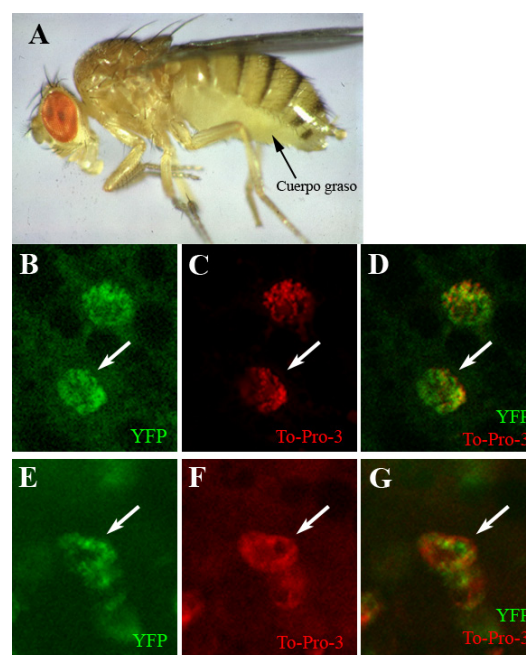


Figura 35. dRYBP no se expresa en el citoplasma de las células del cuerpo graso de moscas infectadas. (A) Localización del cuerpo graso en una mosca adulta. **(B, C y D)** Cuerpo graso de moscas *C564>YFP:dRYBP* no infectadas. **(B)** Expresión de YFP. **(C)** Expresión de To-Pro-3. **(D)** Superposición de las imágenes A y B. Nótese la colocalización de YFP:dRYBP con el To-Pro-3 **(E, F y G)** Cuerpo graso de moscas *C564>YFP:dRYBP* infectadas con bacterias *Ecc15*. **(E)** Expresión de YFP. **(F)** Expresión de To-Pro-3. **(G)** Superposición de las imágenes D y E. Nótese que YFP:dRYBP no se expresa citoplasmáticamente en las células del cuerpo graso de moscas infectadas.

6. Regulación de la expresión de *dRYBP* mediada por microRNAs

Tanto el ARN mensajero como la proteína dRYBP se expresan de una forma ubicua durante todo el desarrollo de *Drosophila*, sugiriendo que su expresión se requiere en todas las células de la mosca (Gonzalez et al., 2008). El control de la regulación de la expresión de *dRYBP* no ha sido estudiada, pero los datos de su expresión y de su función (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008), sugieren que el control de su expresión no parece estar mediado por secuencias reguladoras de la transcripción que pudieran estar localizadas en su promotor para controlar su expresión espacio-temporal. Sin embargo, los niveles de expresión de dRYBP parecen ser importantes para el desarrollo de *Drosophila* (Gonzalez et al., 2008), y el hecho de que sus funciones estén involucradas en procesos como apoptosis y respuesta inmune (Gonzalez and Busturia, 2009) (Apa-

Target Scan Fly	Brennecke	microRNA.org	PicTar
7	7		
			8
	12		
14		14	14
		34	
137			
193		193	
252		252	
		263a	
277		277	277
283		283	283
	284	284	
	304		
		305	
	306		
316		316	
927		927	
954			
956			
958			
960		960	
964		964	
973			
977		977	
981		981	
992			
993			
1007			
1009			
1012			
1013			
1014		1014	
	iab-4-3p		

ricio et al. en preparación), hace pensar que sus niveles de expresión están involucrados en el mantenimiento de la homeostasis celular. Para estudiar la regulación de los niveles de expresión de *dRYBP* y ya que, ésta no parece estar controlada por “enhancers” específicos espacio-temporales, se estudió si la expresión de *dRYBP* podría estar regulada por microRNAs.

Tabla 9: Predicción de los distintos microRNAs que se unen al 3'UTR de *dRYBP* según las distintas bases de datos.

6.1 Análisis de los 3'UTRs del gen *dRYBP* y sus homólogos en ratón y humano

Los microRNAs son pequeñas moléculas de ARN no codificantes, que inhiben la traducción al unirse a la región 3'UTR de sus genes diana (Bushati and Cohen, 2007; Inui et al., 2010). Como primera aproximación para estudiar si *dRYBP* podría estar regulado por microRNAs, se analizó bio-informáticamente si en la región 3'UTR del gen *dRYBP* existían sitios de unión para algún microRNA. Se utilizaron las distintas bases de datos disponibles que predicen los sitios de unión de los microRNAs a los 3'UTR de un determinado gen. Las bases de datos utilizadas fueron: <http://www.targetscan.org/>, <http://picTar.mdc-berlin.de/>, <http://www.microrna.org/microrna/home.do> y (Brennecke et al., 2003). El análisis bio-informático realizado predice que a la región 3'UTR del gen

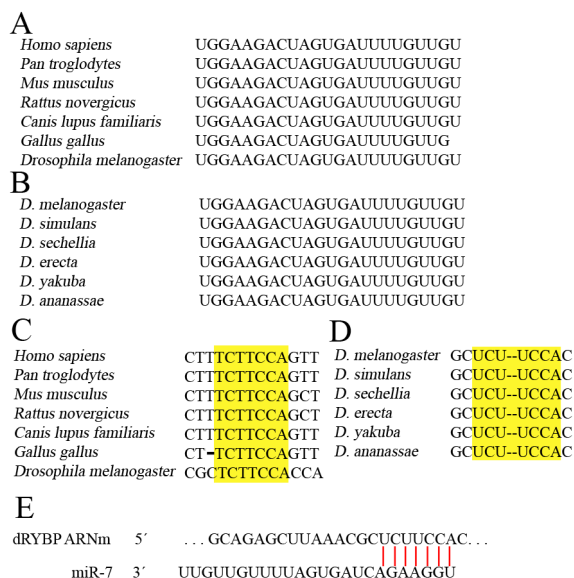


Figura 36. Conservación filogenética del *microRNA-7*. (A) Conservación en vertebrados. (B) Conservación en las distintas especies de *Drosophila*. (C) Conservación de la región de unión del *miR-7* en vertebrados. (D) Conservación de la región de unión del *miR-7* en *Drosophila*. (E) Secuencias de unión del *miR-7* a la región 3'UTR de *dRYBP*.

dRYBP se unen al menos 33 microRNAs (Tabla 9), sugiriendo que la expresión del gen *dRYBP* puede estar regulada por distintos microRNAs. También, se analizó si a la región 3'UTR de los homólogos de *dRYBP* en ratón (RYBP y YAF2) (Sawa et al., 2002) y humanos (RYBP/DEDAF y YAF2) (Garcia et al., 1999) se unían los mismos u otros microRNAs que pudiesen estar regulando la expresión de estos genes en humanos y ratón. Como se observa en el Anexo 3 a la región 3'UTR de estos genes también se une un gran número de microRNAs. Además, tanto el *microRNA-7* (Tablas 9, Anexo 2 y Figura 36) como la región de unión de *miR-7* a los genes *dRYBP*, *Yaf2* y *RYBP* también esta conservada (Figura 36), sugiriendo, que el *microRNA-7* puede estar regulando la expresión génica de estos tres genes durante el desarrollo de la mosca, del

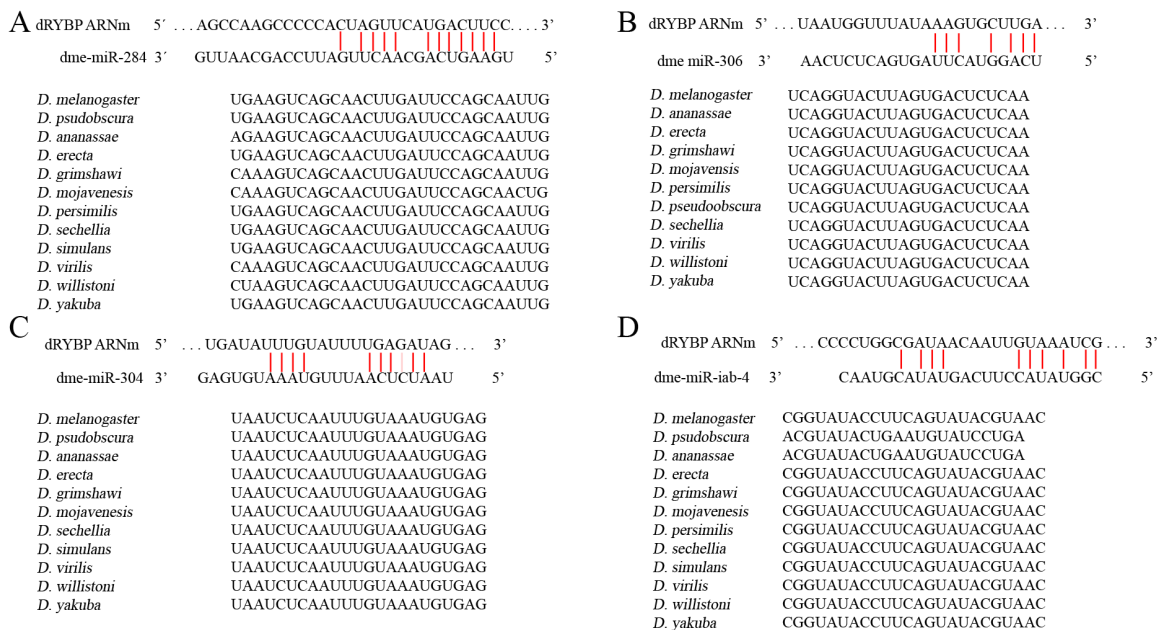


Figura 37 Conservación filogenética del *miR-284*, *miR-304*, *miR-306* y *miR-iab-4*. (A) Conservación filogenética del *miR-284* y su unión al 3'UTR de *dRYBP*. (B) Conservación filogenética del *miR-306* y su unión al 3'UTR de *dRYBP*. (C) Conservación filogenética del *miR-304* y su unión al 3'UTR de *dRYBP*. (D) Conservación filogenética del *miR-iab-4* y su unión al 3'UTR de *dRYBP*.

ratón y del humano. Además, los microRNAs *miR-284*, *miR-304*, *miR-306* y *miR-iab-4-5p* no solo se encuentran conservados en distintas especies de *Drosophila* (Figura 37), sino, que además, esta conservado su sitio de unión al gen *dRYBP*.

6.2 Efectos fenotípicos de la sobre-expresión de los micro RNAs: *miR-7*, *miR-284*, *miR-304*, *miR-306* y *miR-iab-4-5p*

Debido a que los microRNAs ejercen su función, en la mayoría de los casos, reprimiendo la expresión génica (Bushati and Cohen, 2007) se analizó si la sobre-expresión de los siguientes microRNAs: *miR-7*, *miR-284*, *miR-304*, *miR-306* y *miR-iab-4-5p* presentaban fenotipos relacionados con la falta de función del gen *dRYBP*. Las moscas transgénicas conteniendo los vectores de sobre-expresión de *miR-7* y de *miR-iab-4-5p* estaban disponibles (Brennecke et al., 2003; Biemar et al., 2005), pero sin embargo, las moscas transgénicas conteniendo los vectores de sobre-expresión para los microRNAs: *miR-284*, *miR-304* y *miR-306* no lo estaban, por lo que se procedió a su clonaje en el vector pUASt-DsRed (ver Materiales y Métodos) que, además de permitir la sobre-expresión de los miRNAs, permite tanto la detección de su expresión *in vivo*, mediante la observación de la expresión de la proteína fluorescente Ds-Red, como su detección en experimentos de RT-qPCR mediante la cuantificación de los niveles de expresión de Ds-Red.

En un principio, se sobre-expresaron los microRNAs con la línea *enGal4*, que se expresa en los compartimentos posteriores de los segmentos, y se analizaron los fenotipos en las larvas y en los individuos adultos para poder relacionar estos fenotipos con los fenotipos de falta de función producidos por el gen *dRYBP* en éstos tejidos y en éstos estadios de desarrollo. La sobre-expresión de *miR-7*, *miR-284*, *miR-304*, *miR-306* y *miR-iab-4-5p* presenta distintos fenotipos a lo largo del desarrollo, algunos de ellos relacionados con la falta de función del gen *dRYBP* (Tabla 10). Como se obser-

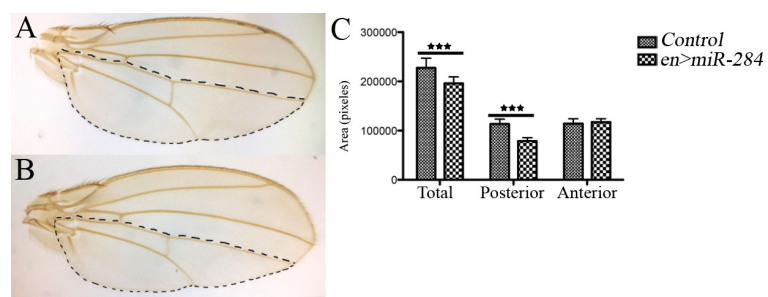


Figura 38. Fenotipos asociados a la sobre-expresión del microRNA-284. (A) Ala *y¹Df(1)^{w67c23}* (control). **(B)** Ala *en>miR-284*. Nótese la disminución del tamaño del compartimento posterior del ala. **(C)** Cuantificación del efecto en la disminución del tamaño del ala mediante medición de las área total y de los compartimentos anteriores y posteriores de moscas *y¹Df(1)^{w67c23}* (control) y *en>miR-284*. Nótese la disminución del tamaño total de ala y del compartimento posterior de la misma. (***)*p*<0.001).

va en la Tabla 10, la sobre-expresión de *miR-304* con la línea *enGal4* no presenta ningún fenotipo sugiriendo que *miR-304*, si es que ejerce una regulación de la expresión de *dRYBP*, debe de ser en otros tejidos o estadios que no se revelan usando la línea *enGal4*. Por otro lado, la sobre-expresión de *miR-iab-4-5p* es letal en larvas de primer estadio (Tabla 10), por lo que, no se han podido estudiar sus fenotipos en las

distintas fases del desarrollo, dificultando la comparación de fenotipos con la falta de función de *dRYBP*, utilizando la línea *enGal4*. Sin embargo, tanto la sobre-expresión de *miR-284* (Tabla 10 y Figura 38), *miR-306* (Tabla 10 y Figura 39), y *miR-7* (Tabla 10 y Figura 40) producen con mayor o menor expresividad y penetrancia fenotipos relacionados con la falta de función de *dRYBP* (Gonzalez et al., 2008) como son la progresiva letalidad durante el desarrollo, la reducción del tamaño del ala, defectos en la formación del patrón de venas, la aparición de ampollas en el ala y la aparición de tumores me-

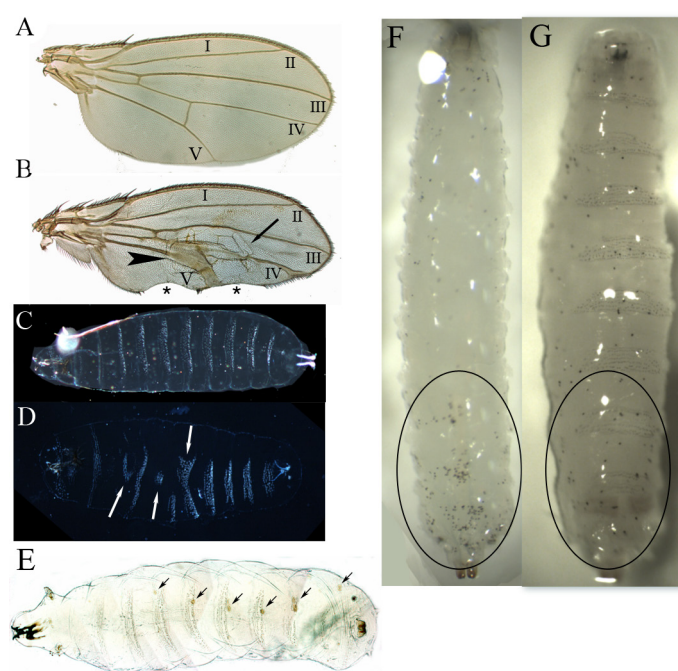


Figura 39. Fenotipos asociados a la sobre-expresión del microRNA-306. (A) Ala *y¹Df(1)w67c23* (control). **(B)** Ala *en>miR-306*. Nótese la disminución en el tamaño del compartimento posterior del ala y la desaparición de parte de la vena V y IV (flechas). **(C)** Cuantificación del efecto en la disminución del tamaño del ala mediante medición de las área total y de los compartimentos anteriores y posteriores de moscas *y¹Df(1)w67c23* (control) y *en>miR-306*. Nótese la disminución del tamaño total de ala, de la parte posterior y de la parte anterior. (***) $p<0.001$ y *) $p<0.01$.

lanóticos en la cutícula de la larva (Tabla 10 y Figuras 38, 39 y 40).

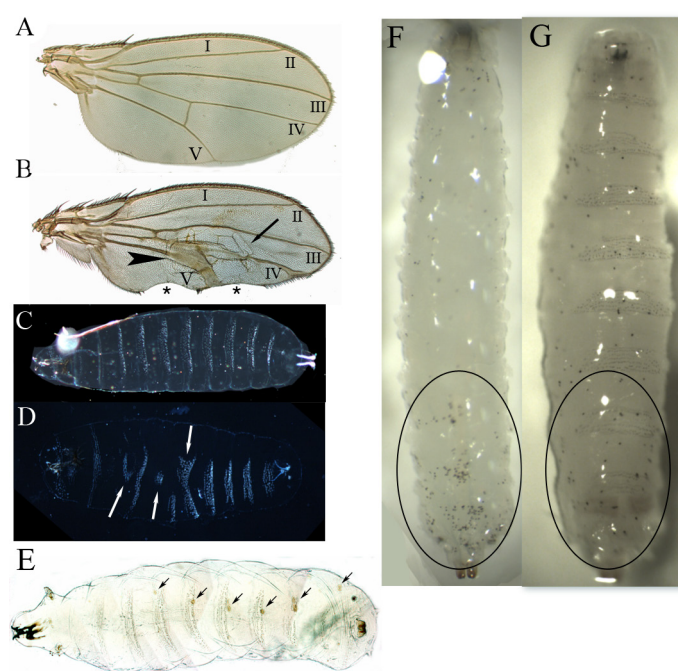


Figura 40. Fenotipos asociados a la de sobre-expresión del microRNA-7. (A) Ala *y¹Df(1)w67c23* (control). **(B)** Ala *en>miR-7*. Nótese la disminución en el tamaño del compartimento posterior del ala, la formación de ampolla en la parte posterior (Flecha), engrosamiento de la vena V (Cabeza de flecha) y muescas en la parte posterior (*). **(C)** Cutícula de larva *y¹Df(1)w67c23* (control). **(D)** Cutícula de larva *en>miR-7* mostrando desorganización en el patrón de los dentículos de los segmentos ventrales. **(E)** Larva *en>miR-7* mostrando tumores melanóticos en la cutícula (Flechas). **(F)** Larva *y¹Df(1)w67c23* mostrando las "Crystal cells" (circulo). **(G)** Larva *en>miR-7* mostrando las "Crystal cells" (circulo). Nótese la disminución en el número de "Crystal cells".

Línea Gal4	microRNA	Letalidad	Tumores melanóticos	Tamaño del ala	Ampollas en las alas	Genitalia
en	miR-7	Durante el desarrollo	En la cutícula	Reducido	Si	Normal
en	miR-284	Letalidad embrionaria	No	Reducido	No	Normal
en	miR-304	No	No	Igual	No	Normal
en	miR-306	Letalidad embrionaria	En los espiráculos	Reducido	No	Malformada
en	miR-iab-4-3p	Letalidad embrionaria				
en	dRYBP _{RNAi}	Durante el desarrollo	En la cutícula	Reducido	Si	Normal

Tabla 10: Fenotipos de sobre-expresión producidos por los microRNAs: miR-7, miR-284, miR-304, miR-306 y miR-iab-4.

Debido a que los fenotipos presentados por la sobre-expresión de *miR-7* estaban relacionados con los fenotipos asociados con la inactivación de *dRYBP*, y además debido a que *miR-7* es uno de los microRNAs conservados que no solo regulan la expresión de *dRYBP* sino que, también, puede estar regulando la expresión de los homólogos de *dRYBP* en humanos y ratón se decidió profundizar en el estudio de la regulación de la expresión de *dRYBP* mediada por *miR-7*.

6.3 Regulación de la expresión de *dRYBP* mediada por el microRNA-7

6.3.1 Expresión del miR-7 durante el desarrollo de *Drosophila*

Se estudió la expresión de *miR-7* durante el desarrollo de *Drosophila* mediante experimentos de hibridación *in situ* (Materiales y Métodos), usando una sonda de ADN específica para *miR-7* (hsa-miR-7, Exiqon, #38485-01#). En primer lugar, se comprobó la especificidad de la sonda usando discos imaginales de larvas *en>miR-7-Ds-Red*. Como se observa en la Figura 41, las células del compartimento posterior del disco imaginal de ala presentan mayor expresión que, las células del compartimento anterior, lo que sugiere que la sonda hsa-miR-7 reconoce específicamente la expresión de *miR-7*.

Se analizó la expresión de *miR-7* en los tejidos imaginales de larvas silvestres y larvas *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}*, es decir, deficientes para *miR-7* (Hazelrigg et al., 1990; Li and Carthew, 2005). Como se observa en la Figura 4, en los discos imaginales de larvas *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}* no se detectó la expresión de *miR-7* indicando, de nuevo, la especificidad de la sonda utilizada. (Figura 41). Sin embargo, como se describe a continuación, se observó expresión específica en los diferentes tejidos imaginales (Figura 41).

En el disco imaginal de ojo, la expresión de *miR-7* se detecta en las células diferenciadas (Pichaud et al., 2001), como previamente ha sido descrito (dato no mostra-

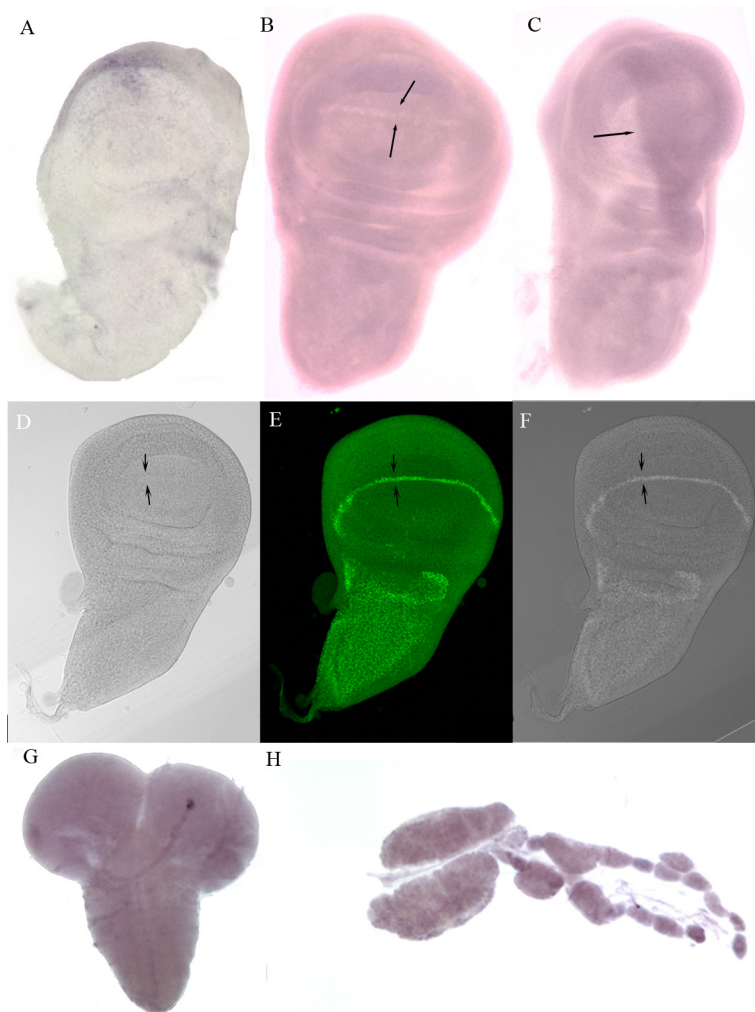


Figura 41. Expresión del microRNA-7 durante el desarrollo. (A) Expresión de *miR-7* en un disco imaginal de ala de larvas *Dfexu1/miR-7 Δ 1*. Nótese la falta de expresión en estos discos. (B) Expresión de *miR-7* en un disco imaginal de alas control (*y1Df(1)w67c23*) mostrando la expresión en el borde dorso-ventral del disco (flechas). (C) Expresión de *miR-7* en un disco imaginal de ala *en>miR-7* mostrando altos niveles de la expresión del *miR-7* en el compartimento posterior del mismo (flecha). (D, E y F) Disco imaginal de ala *y1Df(1)w67c23* mostrando la expresión de *miR-7* (azul) junto con la expresión de la proteína Cut (verde). Nótese que la expresión del *miR-7* no coincide con la expresión de Cut (flechas). (D) Expresión de *miR-7*. (E) Expresión de Cut. (F) Superposición de las imágenes D y E. (G) Expresión de *miR-7* en la cuerda nerviosa y cerebro. (H) Expresión de *miR-7* en la glándula linfática.

do) (Li and Carthew, 2005). Además, *miR-7* también se expresa de forma ubicua en los discos imaginales de pata y antena. Por otro lado,

se observa expresión de *miR-7* en el cerebro, en el sistema nervioso central y en la glándula linfática, siendo su expresión ubicua en estos tres tejidos (Figura 41).

En el disco imaginal de ala la expresión es débil y ubicua, aunque presenta una mayor expresión en un grupo determinado de células, que se localizan en el margen dorso/ventral (Figura 41). El borde dorso/ventral del ala esta compuesto por dos tipos de células (O'Brochta and Bryant, 1985), las células que forman el borde propio conocidas como "boundary cells", y que expresan el factor de transcripción Cut (Jack et al., 1991), y las células que rodean a éstas tanto dorsal como ventralmente, conocidas como "non boundary cells" o células adyacentes al borde, y que expresan el factor de transcripción Senseless (Nolo et al., 2000) (Figura 3 de la introducción). Para determinar que células del borde dorso/ventral del disco imaginal de ala expresaban el *microRNA-7* con mayor intensidad se realizó una doble tinción con la sonda hsa-miR-7 y con el anticuerpo anti-Cut. La expresión de *miR-7* en el disco imaginal de ala es complementaria a la expresión de la proteína Cut (Figura 41), indicando que la expresión de *miR-7*

está confinada a las células adyacentes al borde o lo que es lo mismo en las “non boundary cells”. La expresión de *miR-7* en las “non boundary cells” del disco imaginal de ala sugiere que *miR-7* podría estar regulando el tamaño del disco a través de la regulación de sus genes diana en el borde dorso/ventral del mismo.

6.3.2 *miR-7* regula la expresión de dRYBP

La expresión de *dRYBP* en el disco imaginal de ala es uniforme a lo largo de todo el disco (Gonzalez et al., 2008). Para comprobar si *miR-7* regula los niveles de expresión de *dRYBP*, primero, se estudió si la sobre-expresión de *miR-7* modifica los niveles de expresión de *dRYBP*, mediante el análisis de los niveles de expresión de *dRYBP* por RT-qPCR, y segundo se estudió si la falta de función de *miR-7* estaba regulando la expresión de *dRYBP* durante el desarrollo.

Se analizó, mediante RT-qPCR, los niveles de expresión de *dRYBP* en condiciones de sobre-expresión de *miR-7*. Para ello se sobre-expresó *miR-7* en el embrión con la línea *MS444Gal4*, que se expresa de forma ubicua y durante todo el desarrollo de la mosca. Como se muestra en la gráfica de la Figura 42, la sobre-expresión de *miR-7* produce una disminución significativa en los niveles de expresión de *dRYBP*.

Finalmente, se analizó si *dRYBP* estaba siendo regulado por *miR-7* durante el desarrollo, para ello, se analizaron los niveles de expresión de *dRYBP* en discos imaginales de alas deficientes para *miR-7*. Mediante RT-qPCR, se analizaron los niveles de expresión de *dRYBP* en discos imaginales de larvas *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}* y larvas control. La falta de función de *miR-7* en el disco imaginal de ala produce un aumento significativo en la expresión de *dRYBP* (Figura 42B).

Los resultados aquí expuestos indican que la variación de los niveles de expresión de *miR-7*, tanto en sobre-expresión como en falta de función, modulan los niveles de expresión de *dRYBP*, lo que sugiere que *miR-7* regula negativamente la expresión de *dRYBP*.

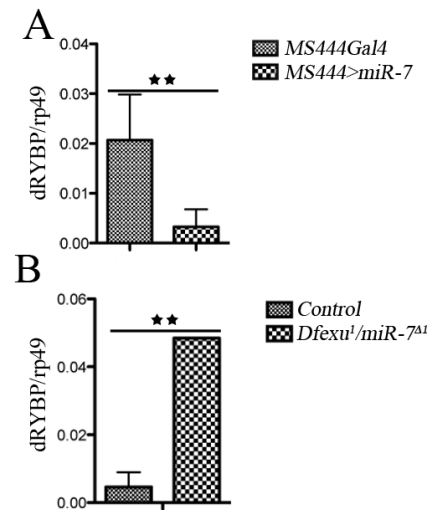


Figura 42. Altos y bajos niveles del *miR-7* regulan los niveles de expresión de *dRYBP*. (A) Cuantificación de los niveles de expresión de *dRYBP* en embriones *MS444* y *MS444>miR-7*. Nótese la disminución en los niveles de expresión de *dRYBP* cuando se sobre-expresa el *miR-7*. (**p<0.005). (B) Cuantificación de los niveles de expresión de *dRYBP* mediante RT-qPCR de discos imaginales de ala de larvas *y¹Df(1)^{w67c23}* y *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}*. Nótese el aumento en los niveles de expresión de *dRYBP* en los discos de larvas *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}*. (**p<0.005).

6.3.3 ¿Regula *miR-7* los niveles de expresión de *dRYBP* mediante la interacción con su 3'UTR?

Para demostrar que el gen *dRYBP* es regulado post-transcripcionalmente por el *microRNA-7* se generó un “sensor” molecular, denominado “sensor *dRYBP*” conteniendo la región 3'UTR del gen *dRYBP* (Materiales y Métodos) y la proteína GFP, lo que permite monitorizar la interacción de los microRNAs que se unen al 3'UTR del gen *dRYBP* mediante el análisis de la expresión de la proteína GFP. Además, también se realizó la construcción “sensor *dRYBP* mut” en la cual se eliminó el sitio de unión de *miR-7* al 3'UTR del gen *dRYBP* (ver Materiales y Métodos) para poder demostrar que la regulación de los niveles de expresión de *dRYBP* por *miR-7* es de forma directa a través de la región 3'UTR del gen *dRYBP*.

Se analizó la expresión de GFP en discos imaginales de larvas *en>miR-7*; “sensor *dRYBP*”. La expresión de la proteína GFP es menor en el compartimento posterior de los discos *en>miR-7-Ds-Red*; “sensor *dRYBP*” cuando se compara con el compartimento anterior. Desafortunadamente, debido a que los niveles de reducción son tan pequeños, no puedo presentar la evidencia experimental, que demuestra que *miR-7* está regulando la expresión de *dRYBP*. Las razones por lo que ésta reducción de los niveles de expresión sea tan débil bien podría ser debido a la fuerte regulación mediada por los distintos microRNAs que se unen a *dRYBP* (al menos 33, parte 6.1 de los resultados). Por tanto, la detección del efecto de la sobre-expresión de uno de ellos, en este caso *miR-7*, sobre la construcción “sensor *dRYBP*” es muy difícil de mostrar. Se están realizando otras aproximaciones experimentales para solventar estas dificultades.

6.3.4 Fenotipos asociados a la falta de función del *microRNA-7*

Para analizar los fenotipos asociados a la falta de función de *miR-7*, se utilizaron las deficiencias *miR-7^{Δ1}* (Li and Carthew, 2005) y *Dfexu¹* (Hazelrigg et al., 1990), que eliminan la región genómica en la que se encuentra localizado el *microRNA-7*. Los fenotipos asociados a la falta de función del *microRNA-7* se estudiaron en individuos resultantes del cruce entre machos *miR-7^{Δ1}/CyOGFP* con hembras *Dfexu¹/CyOGFP* que fueron seleccionados por la ausencia de expresión de GFP.

Se analizó la viabilidad de los individuos *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}* durante el desarrollo. Se observó que solamente el 14% de los individuos deficientes para *miR-7* llegaban a la fase adulta (Figura 43A). Este resultado, sugiere que *miR-7* es necesario para el desarrollo del individuo.

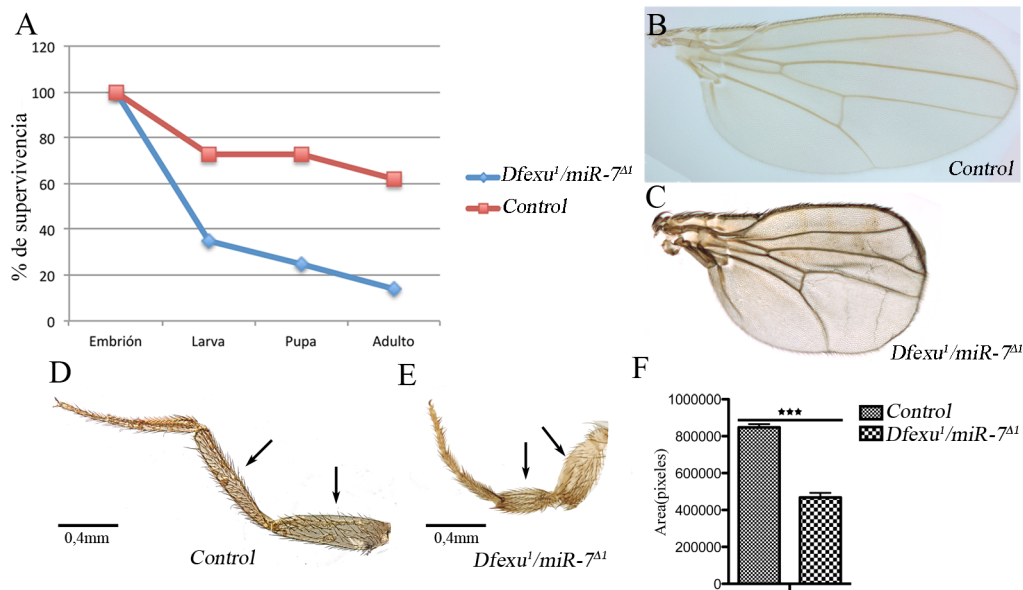


Figura 43. Fenotipos asociados a la falta de función del microRNA-7 . (A) Cuantificación de la letalidad a lo largo del desarrollo debido a la falta de función de *miR-7*. (B) Ala *y¹Df(1)^{w67c23}* (control). (C) Ala *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}*, nótese la disminución del tamaño del ala en comparación al ala silvestre. (D) Pata metatorácica *y¹Df(1)^{w67c23}*. (E) Pata metatorácica *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}*, obsérvese la reducción en el tamaño y el engrosamiento del fémur (flecha) y de la tibia (cabeza de flecha). (F) Cuantificación del efecto en la disminución del tamaño del ala mediante medición de las área total de moscas *y¹Df(1)^{w67c23}* (control) y *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}*. Nótese la disminución del tamaño total de ala. (***) $p < 0.001$.

Las moscas *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}* que sobreviven presentan una disminución en el tamaño del ala, de aproximadamente un 35% (Figura 43C y F). Este resultado, sugiere que la falta de función de *miR-7* ejerce una función sobre el desarrollo del disco imaginal de ala, o bien que su falta de función induzca apoptosis durante el desarrollo. Además, la falta de función induce una malformación en las patas, observada por el acortamiento del eje próximo/distal en el fémur y la tibia, y un engrosamiento de estas zonas (Figura

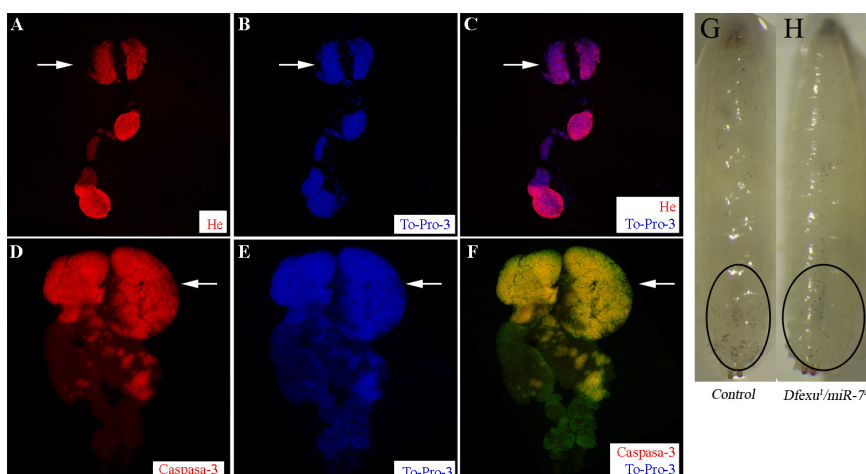


Figura 44. Efecto de la falta de función del microRNA-7 en la glándula linfática y en las "Crystal cells". (A, B y C) Glándula linfática *y¹Df(1)^{w67c23}*. (A) Expresión de Hemese (He). (B) Expresión de To-Pro-3. (C) Superposición de las imágenes A y B. (D, E y F) Glándula linfática *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}*. Obsérvese el aumento de tamaño de la glándula linfática comparado con la glándula linfática control. (D) Expresión de Caspasa-3 activada. (E) Expresión de Cut. (F) Superposición de las imágenes D y E. (G) Larva *y¹Df(1)^{w67c23}* mostrando la "Crystal cells". (H) Larva *Dfexu¹/miR-7^{Δ1}* mostrando las "Crystal cells". Nótese la disminución en el número de "Crystal cells".

43D y E). Este resultado indica de nuevo, que *miR-7* tiene una función durante el desarrollo de *Drosophila*, posiblemente en la regulación de la apoptosis o de la

proliferación.

Por otro lado, las larvas *Dfexu*¹/*miR-7*^{Δ1} presentan las glándula linfáticas de un gran tamaño (Figura 44D). comparado con las glándulas control (Figura 44A). Para investigar si este aumento del tamaño de la glándula era debido a proliferación de los hemocitos, se cuantificó el número de “Crystal cells” en larvas *Dfexu*¹/*miR-7*^{Δ1}. Como se puede observar en la Figura 44, larvas *Dfexu*¹/*miR-7*^{Δ1} presentan un menor número de “Crystal cells” en comparación con larvas control (Figura 44F). También, se sobre-expresó *miR-7* con la línea *HeGal4* que dirige la expresión tanto en la glándula linfática como en los hemocitos circulantes, lo que nos permitió estudiar los fenotipos de sobre-expresión de *miR-7* en el sistema hematopoyético. Se analizó el número de las “Crystal cells” en larvas *He>miR-7* observándose un menor número de “Crystal cells” en comparación con el control (Figura 40). Además también se analizó el tamaño de la glándula linfática (Figura 45). Como se observa en la Figura 45, la glándula linfática de larvas en las que se ha sobre-expresado *miR-7* presentan un tamaño normal. Los fenotipos aquí mostrados indican que la falta de función de *miR-7* tiene un papel durante el proceso de hematopoyesis en *Drosophila*.

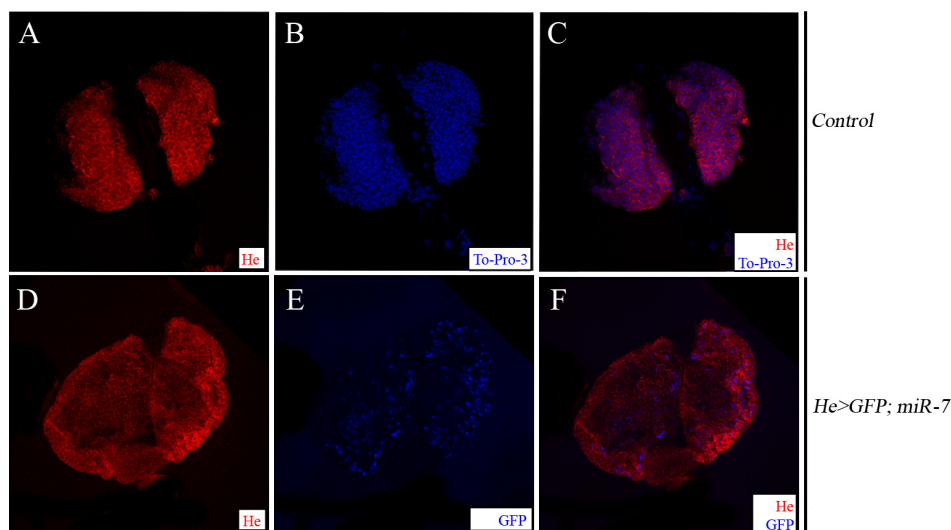


Figura 45. Efecto de la sobre-expresión del microRNA-7 en la glándula linfática. (A, B y C) Glándula linfática *y¹Df(1)^{w67c23}*. (A) Expresión de Hemese (He). (B) Expresión de To-Pro-3. (C) Superposición de las imágenes A y B. (D, E y F) Glándula linfática *He>miR-7*. (D) Expresión de Hemese (He). (E) Expresión de GFP. (F) Superposición de las imágenes D y E. Obsérvese que no existe diferencia de tamaño entre la glándula linfática silvestre y en la que el *miR-7* está sobre-expresado.

6.3.5 Función del *miR-7* en el desarrollo de ala

Debido a los fenotipos adultos observados, se estudió si el tamaño de los discos de ala también, estaban afectados. Para ello se diseccionaron discos imaginales de

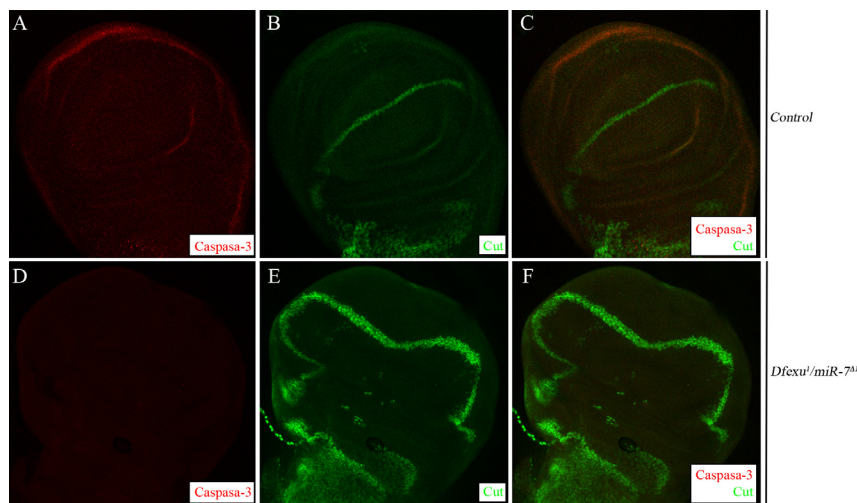
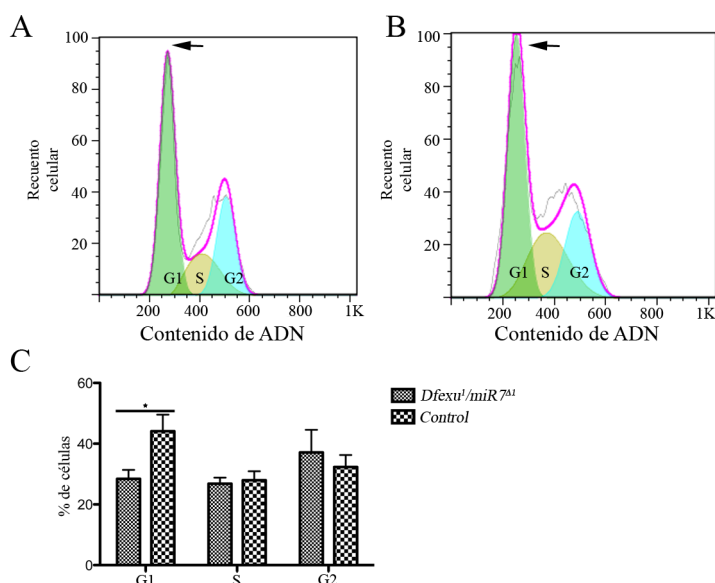


Figura 46. La falta de función de *miR-7* activa la expresión de Cut y no produce apoptosis. (A, B y C) Disco imaginal de ala $y^1, Df(1)^{w67c23}$. **(A)** Expresión de Caspasa-3 activada. **(B)** Expresión de Cut. **(C)** Superposición de las imágenes A y B. **(D, E y F)** Disco imaginal de ala $Dfexu^1/miR-7^{\Delta 1}$. **(D)** Expresión de Caspasa-3 activada. **(E)** Expresión de Cut. **(F)** Superposición de las imágenes D y E. Nótese el aumento en la expresión de Cut (Flechas).

mación morfológica del disco de ala. La diferencia del tamaño del ala podría por tanto ser debida a apoptosis o a fallos en la proliferación. Se estudio primero si la falta de función de *miR-7* producía apoptosis y segundo si existía un defecto en proliferación. Para estudiar si la falta de función de *miR-7* producía apoptosis se analizó la expresión de caspasa-3 activada como marcador de apoptosis (Kondo et al., 1997), en discos imaginales $Dfexu^1/miR-7^{\Delta 1}$. No se observó un aumento de la apoptosis debido a la falta de función de *miR-7* (Figura 46). Para investigar fallos en la proliferación, se analizó el ciclo celular en discos imaginales de larvas de tercer estadio $Dfexu^1/miR-7^{\Delta 1}$, mediante el análisis por citometría de flujo del ciclo celular (FACS). Como se refleja en la Figura 47



los discos imaginales de ala de larvas $Dfexu^1/miR-7^{\Delta 1}$ presentan un 10% más de células en G1 respecto a discos control. Estos resultados indican que el ciclo celular de las células

Figura 47. La falta del microRNA-7 para las células en G1. (A) Ciclo celular de discos imaginales de larvas $y^1, Df(1)^{w67c23}$. **(B)** Ciclo celular de discos imaginales $Dfexu^1/miR-7^{\Delta 1}$. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Nótese la diferencia entre el ciclo celular de discos imaginales control y mutantes para el *miR-7*. (* $p > 0.05$)

*Dfexu*¹/*miR-7*^{Δ1} está parado en G1, explicando los defectos observados en el tamaño final del ala de los individuos adultos.

Los factores que se expresan en las células del borde dorso/ventral no solo son fundamentales para el control del crecimiento del disco, sino, que también son fundamentales para que el disco pare de crecer, y alcance su tamaño final (Herranz and Milan, 2008). Dos vías de señalización son fundamentales para promover y parar crecimiento en el borde del ala: la vía de Wingless y la vía de Notch (figura 3 de la introducción). Dentro de los genes diana de *miR-7* (Anexo 4) no se ha descrito ninguno de los genes de la vía de Wingless. Sin embargo, genes de la vía de Notch son genes diana de *miR-7*, como *hairy* y *E(spl)* (Anexo 4 y (Stark et al., 2003; Lai et al., 2005)).

Para investigar, la función de *miR-7* en el crecimiento del disco de ala, se estudio la expresión de Senseless (proteína diana de la vía de Wingless) (Nolo et al., 2000), y de Cut (proteína diana de la vía de Notch) (de Celis et al., 1996) en discos *Dfexu*¹/*miR-7*^{Δ1} y discos *nubGal4>miR-7-Ds-Red*. Como se observa en la Figura 48, la expresión de Cut, que normalmente esta confinada a una línea de 2 o 3 células (Figura 48) (de Celis et al., 1996), se encuentra expandida a 5 o 6 células en discos imaginales deficientes para *miR-7*. En cambio, la expresión de Cut desaparece en discos imaginales *nub>miR-7*, debido a la sobre-expresión de *miR-7* (Figura 48). El análisis de la expresión de Senseless, también sugiere que la formación del borde dorso/ventral se encuentra alterada. Por un lado, el patrón de expresión de Senseless se encuentra alterada en discos *Dfexu*¹/*miR-7*^{Δ1} (Figura 48), y por otro lado, la expresión de Senseless desaparece en discos *nub>miR-7* (Figura 49). Estos resultados indican que *miR-7* está implicado en la formación del borde dorso/ventral.

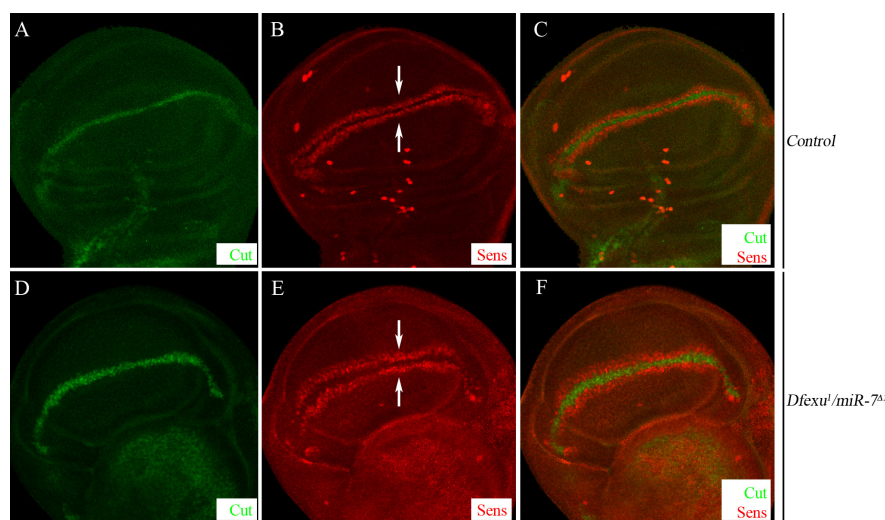


Figura 48. Expresión de Senseless y Cut en discos imaginales deficientes para *miR-7*. (A, B y C) Disco imaginal de ala *y*¹,*Df*(1)^{w67c23}. (A) Expresión de Cut. (B) Expresión de Senseless (Sens). (C) Superposición de las imágenes A y B. (D, E y F) Disco imaginal de ala *Dfexu*¹/*miR-7*^{Δ1}. (D) Expresión de Cut. (E) Expresión de Senseless (Sens). Nótese la expresión irregular de Sens en el borde dorso/ventral (flecha) (F) Superposición de las imágenes D y E.

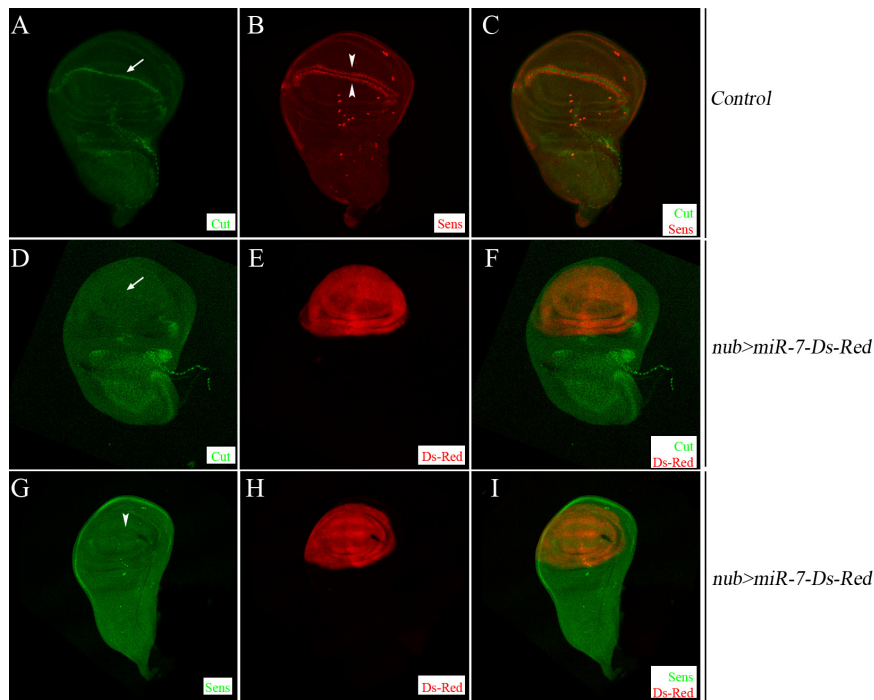


Figura 49. Efecto de la sobre-expresión de *miR-7* en la expresión de *Senseless* y *Cut*. (A, B y C) Disco imaginal de ala *y¹,Df(1)^{w67c23}*. (A) Expresión de *Cut*. Obérvase la expresión de *Cut* en el borde dorso/ventral (flecha) (B) Expresión de *Senseless*. Obérvase la expresión de *Senseless* en el borde dorso ventral (cabeza de flecha) (C) Superposición de las imágenes A y B. (D, E y F) Disco imaginal de ala *nub>miR-7-Ds-Red*. (D) Expresión de *Cut*. Nótese la desaparición del dominio de expresión de *Cut* en el borde dorso/ventral. (E) Expresión de *Ds-Red*. (F) Superposición de las imágenes D y E. (G, H e I) Disco imaginal de ala *nub>miR-7-Ds-Red*. Nótese la desaparición del dominio de expresión de *Sens* en el borde dorso/ventral. (G) Expresión de *Senseless* (*Sens*). (H) Expresión de *Ds-Red*. (I) Superposición de las imágenes G y H.

Finalmente, se analizaron los niveles de expresión de la proteína *Cut* en discos imaginales en los que se había sobre-expresado la proteína *dRYBP*. Discos imaginales *Sd>dRYBP* muestran una reducción en la expresión de *Cut* (Figura 50). Estos datos sugieren que *dRYBP*, al igual que el *microRNA-7* regulan la formación del borde dorso/ventral durante el desarrollo del

disco imaginal de ala. Aunque los mecanismos por los cuales *miR-7* y *dRYBP* están regulando el mantenimiento del borde dorso/ventral están todavía por esclarecer. Los resultados aquí presentados indican, que los niveles de expresión de *miR-7* y *dRYBP* están regulando la expresión de *Cut* en el borde dorso/ventral, y por lo tanto sugieren

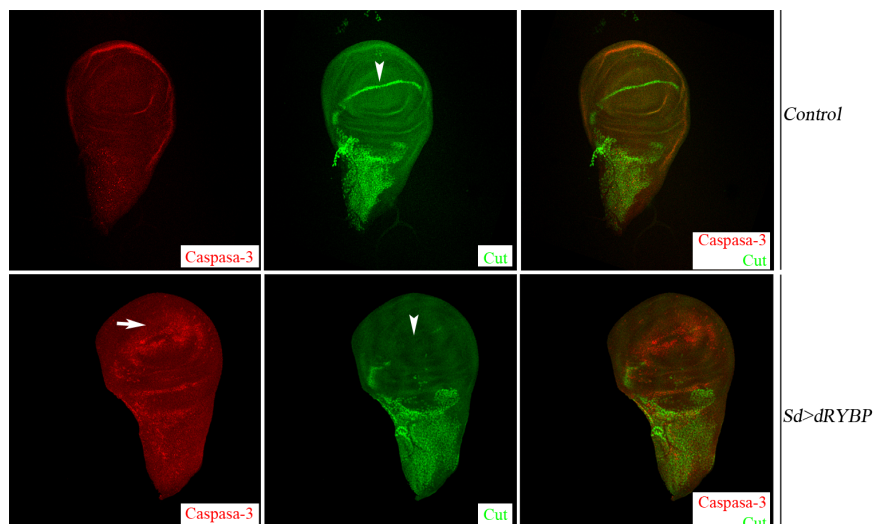


Figure 50. Altos niveles de *dRYBP* inducen apoptosis y la reducción de *Cut*. (A, B y C) Disco imaginal de ala *y¹,Df(1)^{w67c23}*. (A) Expresión de *Caspasa-3* activada. (B) Expresión de *Cut*. (C) Superposición de las imágenes A y B. (D, E y F) Disco imaginal de ala *Sd>dRYBP*. (G) Expresión de *Caspasa-3* activada. (H) Expresión de *Cut*. (I) Superposición de las imágenes G y H.

que *miR-7* y *dRYBP* regulan la ruta de Notch, y que quizás, a su vez *miR-7* y *dRYBP* sean regulados por la vía de Wntless.

DISCUSIÓN

1. Función del gen *dRYBP* en la regulación epigenética de la expresión génica

Durante el desarrollo de los organismos, los estados transcripcionales de los genes se establecen o bien activados o bien reprimidos dependiendo del contexto celular, del proceso biológico o de la fase del desarrollo. Estos estados transcripcionales tienen que ser fielmente mantenidos a lo largo de la proliferación, para que tenga lugar un desarrollo normal. Además, también tienen que tener la capacidad de ser dinámicamente modulables para que las células puedan ajustarse a señales externas e internas y así mantener una homeostasis celular a través de la regulación de la expresión génica. Las proteínas PcG y trxG controlan la memoria transcripcional, que permite el mantenimiento de los estados transcripcionales. El genoma de *Drosophila* codifica para al menos 40 proteínas PcG/trxG diferentes que contienen diversos dominios funcionales y que se agrupan en complejos proteicos que exhiben funciones bioquímicas específicas entre las que se incluyen la deposición de marcas en las histonas, como acetilación, metilación y ubiquitinación, que aseguran el mantenimiento de la expresión génica a lo largo de la proliferación (Ringrose and Paro, 2007; Schuettengruber et al., 2007; Schwartz and Pirrotta, 2008; Schuettengruber and Cavalli, 2010; Schuettengruber et al., 2011).

Además de las proteínas PcG o trxG que son componentes esenciales de éstos complejos, existen otras proteínas PcG/trxG que han sido clasificadas como “proteínas asociadas a PcG/trxG” y que no forman parte de los complejos mayoritarios, pero que tienen la capacidad de asociarse con ellos (Busturia et al., 2001; Faucheux et al., 2003; Bejarano and Busturia, 2004). Este tipo de proteínas están siendo de gran interés, ya que se cree que son las responsables de proveer dinamismo, plasticidad y especificidad temporal o espacial al sistema de regulación epigenética mediado por las proteínas PcG/trxG. Una de éstas proteínas es dRYBP (*Drosophila* Ring1 and YY1 Binding Protein) objeto de estudio de esta Tesis (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008).

En los mecanismos de regulación epigenética mediados por las proteínas PcG/trxG es instrumental el reclutamiento y la formación de los complejos multiméricos proteicos que interaccionan con la cromatina. En este proceso intervienen las secuencias PREs (Polycomb Response Elements) y TREs (Trithorax Response Elements) que se encuentran en sus genes diana y que sirven como plataformas para el reclutamiento

to de los complejos PcG/trxG al ADN (Ringrose and Paro, 2007).

Trabajos del laboratorio indicaron que, la proteína dRYBP interacciona molecularmente con las proteínas de los grupos PcG y trxG (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008). Sin embargo, era importante determinar cuales eran sus genes diana para estudiar los mecanismos mediados por dRYBP. La falta de función de dRYBP no presenta fenotipos homeóticos, pero sin embargo, la combinación de mutantes homocigóticos para *dRYBP* con mutaciones heterocigóticas para *PcG* y/o *trxG* presentaban débiles fenotipos homeóticos en las patas y en el abdomen de las moscas (Gonzalez et al., 2008). Debido a que la mayoría de las mutaciones en los genes *PcG* y *trxG* son letales homocigóticas embrionarias, el análisis fenotípico no se podía realizar en la mosca adulta, por lo que en este trabajo de Tesis, se propuso analizar si la proteína dRYBP regulaba la expresión de los genes homeóticos durante el desarrollo embrionario. Los resultados indicaron que la falta de función de *dRYBP* no muestra un efecto en la expresión embrionaria de las proteínas homeóticas UBX y ABD-B (Figura 13). Además, tampoco se observaron diferencias en la expresión de éstas proteínas en mutantes homocigóticos para *dRYBP* en combinación con mutantes homocigóticos para *Sce* y/o *Pc*. (Figura 13), ambos del grupo Polycomb. Esta falta de efecto en la expresión de los genes homeóticos podría ser debido, o a que el gen *dRYBP* no regule la expresión de los genes homeóticos, o bien, que el fuerte componente materno de la proteína dRYBP (Bejarano et al., 2005) y de las proteínas PcG (Haynie, 1983; Mozer and Dawid, 1989) no permita visualizar el efecto en los embriones.

Aunque *dRYBP* no se comportaba como un gen *PcG/trxG* “típico”, debido a que los fenotipos asociados a su falta de función no producen fenotipos homeóticos (Figura 15, (Gonzalez et al., 2008)), era importante conocer si *dRYBP* se integraba en los mecanismos de regulación mediado por las proteínas PcG/trxG. Para ello se analizó si la represión mediada por el elemento MCP (Busturia et al., 2001), un PRE (Polycomb response element) del gen homeótico *Abdominal-B*, era dependiente de la función de *dRYBP*. Los resultados muestran que la ausencia de *dRYBP* impide la represión mediada por el elemento MCP (Figura 14). Este resultado indica que la proteína dRYBP participa en los mecanismos que median la regulación epigenética controlada por proteínas PcG/trxG. Además, estos resultados demuestran que los genes homeóticos son genes diana de la proteína dRYBP.

Debido a que *dRYBP* y su homólogo RYBP/YAF2 interacciona con proteínas de los complejos mayoritarios, como PCR1, y con la proteína PHO (Garcia et al., 1999; Beja-

rano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008), una de las pocas proteínas PcG con capacidad de unirse a secuencias específicas al ADN (Brown et al., 1998), y que no pertenece a ninguno de los complejos PcG mayoritarios (Klymenko et al., 2006), se propuso que dRYBP sirviera de eslabón que conecta las proteínas reclutadoras, como PHO, con los complejos PRC1 y PRC2 para promover un reclutamiento de los mismos al ADN (Garcia et al., 1999; Bejarano et al., 2005; Wilkinson et al., 2010). Los resultados de esta Tesis establecen las bases para este estudio en *Drosophila*, donde la existencia y la función del elemento MCP, el PRE al que responde dRYBP, esta muy bien estudiada ((Busturia and Bienz, 1993; Busturia et al., 1997; Busturia et al., 2001). En mamíferos, los mecanismos por los cuales los complejos PcG/trxG reconocen a sus genes diana y reclutan dichos complejos al ADN no están muy claros ya que no se ha conseguido aislar secuencias similares a los PREs en el genoma de los vertebrados. Sin embargo, recientemente se ha descrito una región de 1,8kb denominada D11.12. (Woo et al., 2010), localizada entre los genes homeóticos HOXd11 y HOXd12 que parece asemejarse a las secuencias PRE de *Drosophila* y cuya actividad represora depende de YY1 (PHO en *Drosophila*) y de RYBP, resaltando la conservación mecanística de la regulación epigenética y la importancia del estudio de estos mecanismos en diferentes sistemas modelo para el esclarecimiento de los mecanismos moleculares.

Aunque la función de dRYBP en los mecanismos de regulación epigenética podría ser únicamente el reclutamiento de los complejos al ADN, parece ser que su función en la ubiquitinación de las histonas también puede jugar un papel muy importante en la formación de diferentes complejos que intervienen en diferentes procesos biológicos (Gao et al., 2012; Tavares et al., 2012), poniendo de manifiesto la importancia de las “proteínas asociadas a los complejos PcG/trxG”, como es la proteína dRYBP en proveer dinamismo al sistema de regulación epigenética. Los resultados de esta Tesis también indican que *dRYBP* está involucrado en distintos procesos biológicos como lo muestran los fenotipos asociados a su falta de función (Figura 15), y que se discuten a continuación.

2. Función del gen *dRYBP* y los genes *PcG* en el sistema hematopoyético de *Drosophila*

Los fenotipos asociados a la falta de función del gen *dRYBP* incluyen, entre otros, la aparición de tumores melanóticos (Figura 15), lo que podría estar sugiriendo que *dRYBP* tenga una función en el sistema hematopoyético de *Drosophila* (Minakhina and Steward, 2006; Crozatier and Meister, 2007; Williams, 2007). Además, en la búsqueda

de genes que modulasen la penetrancia del fenotipo del ala debido a la inactivación de *dRYBP*, se encontraron varios genes (por ejemplo *Notch*, Tabla 8) que estaban involucrados en el desarrollo del sistema hematopoyético.

En vertebrados, es cada vez mas evidente que las proteínas PcG mantienen la capacidad de renovación de las células progenitoras hematopoyéticas (HSC; hematopoietic stem cells) mediante mecanismos de activación y represión de genes supresores de tumores y de genes reguladores del desarrollo del sistema hematopoyético para permitir la renovación de las HSC y la diferenciación de las mismas (Konuma et al., 2010; Martin-Perez et al., 2010). Proteínas del grupo Polycomb como BMI1 (PSC en *Drosophila*) o mel-18 (PC en *Drosophila*) están relacionadas con la renovación de las células HSC (Park et al., 2003), y la diferenciación de las mismas (Akasaka et al., 1997) respectivamente. Además, MLL (*trithorax* en *Drosophila*) fue el gen que originalmente se identificó en las translocaciones cromosómicas en pacientes de leucemia (revisado en (Ono et al., 2005)). Por otro lado, el estudio de los niveles de expresión de la proteínas PcG en linfomas de Hodgkin ha revelado que sus niveles están afectados y en particular, la proteína RYBP humana se ha encontrado anómalamente elevada en el 55% de los casos de linfomas de Hodgkin que están asociados con una respuesta desfavorable al tratamiento y de baja supervivencia (van Lohuizen, 1999; Sanchez-Beato et al., 2004; Sanchez-Beato et al., 2006).

El desarrollo del sistema hematopoyético en vertebrados tiene muchas similitudes (y también diferencias) con el desarrollo hematopoyético en *Drosophila*, haciendo que la mosca sea muy adecuada para estudiar los mecanismos involucrados en ambos sistemas (Evans et al., 2003; Crozatier and Meister, 2007; Williams, 2007; Krzemien et al., 2010). El repertorio de las células hematopoyéticas de *Drosophila* es menos variado que en vertebrados y consiste en tres clases principales de hemocitos, los plasmatocitos, las “Crystal cells” y los lamelocitos (Figura 5), cuyas funciones se asemejan al linaje mieloide de los vertebrados, y cuya diferenciación depende de una serie de factores de transcripción y de vías de señalización como la vía de Notch (Evans et al., 2003). La función de las proteínas Polycomb en el sistema hematopoyético de *Drosophila* no ha sido muy estudiada, salvo en casos muy particulares como el de la proteína MXC (Multi Sex Comb) que controla la proliferación de plasmatocitos y “Crystal cells”, así como la diferenciación de hemocitos (Remillieux-Leschelle et al., 2002). También, se ha descrito, que la proteína Brahma, del grupo trxB, está involucrada en el control de la hematopoyesis (Remillieux-Leschelle et al., 2002) y mas recientemente se ha implica-

do a las proteínas PH y E(Pc) en la diferenciación de los hemocitos (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009).

Como primera aproximación para estudiar la función de las proteínas Pc y dRYBP en la hematopoyesis, en este trabajo de Tesis se ha analizado fundamentalmente el número de "Crystal cells" en larvas de tercer estadio. Se ha descubierto que los genes del grupo Polycomb: *Su(z)12*, *esc* y *Sce* no producen, una alteración en el número de "Crystal cells" (Figura 19). Sin embargo, los resultados mostrados en esta Tesis muestran que tanto la inactivación como la sobre-expresión de PH producen una gran cantidad de "Crystal Cells" (Figura 19 y 20). Estos resultados no pueden diferenciar si este aumento es debido solo a un aumento de la proliferación de las mismas, o a una combinación de proliferación de las "Crystal cells" y diferenciación del resto de los hemocitos a "Crystal cells". La variación de los niveles de la proteína PH en el desarrollo de los discos imaginales produce una sobre activación de la ruta de JAK/STAT (Gonzalez et al., 2009), por lo que, en este caso, quizás también los mecanismos subyacentes involucren a esta vía de señalización, que se ha demostrado estar involucrada en el desarrollo del sistema hematopoyético (Minakhina et al., 2011). Por otro lado, la sobre-expresión de los niveles de PHO no producen ningún efecto (Figura 20), pero sin embargo su inactivación reduce el número de "Crystal cells" (Figura 19), de la misma forma que lo hace la inactivación del gen *dRYBP* (Figura 17). En el caso de *dRYBP*, el número de hemocitos totales esta disminuido, por lo que, los mecanismos por los cuales *dRYBP* regula el desarrollo del sistema hematopoyético bien podrían ser por su función en la apoptosis o en la proliferación (Gonzalez et al., 2008; Gonzalez and Busturia, 2009).

Los mecanismos por los cuales estas proteínas estén regulando el desarrollo hematopoyético es incierto. Diversos estudios realizados en mamíferos relacionan los genes homeóticos con el desarrollo del sistema hematopoyético. En primer lugar, las células madre hematopoyéticas expresan genes homeóticos, segundo, ratones deficientes para genes homeóticos presentan defectos hematopoyéticos, y finalmente, la sobre-expresión de algunos genes homeóticos pueden inducir leucemias (Magli et al., 1997; Chiba, 1998). Además, en *Drosophila*, el gen homeótico *Antennapedia* se encarga del mantenimiento del nicho de precursores hematopoyéticos durante el desarrollo de la larva (Mandal et al., 2007). Por lo que, quizás, una de las hipótesis de trabajo es que las proteínas PH, PHO y dRYBP estuvieran regulando la expresión del gen homeotico *Antennapedia* durante el desarrollo del sistema hematopoyético.

3. Función de *dRYBP* en la respuesta inmune de *Drosophila*.

El sistema de regulación epigenética mediada por los genes PcG/trxG es una forma eficiente, dinámica y muy rápida para modular la expresión génica y, por lo tanto, es probable que participen en el control de procesos fisiológicos, en los que el cambio rápido de expresión génica sea fundamental para la supervivencia de los organismos, como es la respuesta inmune.

Drosophila, como todos los insectos, dispone de la respuesta inmune innata para luchar contra los patógenos y, ha desarrollado múltiples mecanismos para reconocer los agentes invasivos y responder a la infección (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Williams, 2007). Los factores involucrados en las repuestas inmune innata de vertebrados y de insectos presentan una gran conservación filogenética. La intensidad y la duración de la respuesta inmune está muy controlada. Por un lado, se requiere una activación rápida y apropiada y por otro lado, una vez que la infección se ha resuelto, se requiere una inhibición efectiva para inhibir la respuesta y prevenir reacciones inflamatorias y enfermedades auto-inmunes (Tabas, 2010; Baker et al., 2011; Wen et al., 2011).

Uno de los mecanismos que participa en la activación y la inhibición de la respuesta inmune es la ubiquitinación (Khush et al., 2002; Zhou et al., 2005; Thevenon et al., 2009; Paquette et al., 2010). Se ha descrito, que la ubiquitinación de IMD a través de cadenas K-63 ubiquitina activa la cascada. Una vez la infección es solventada por el organismo, IMD se des-ubiquitina, y se vuelve a ubiquitinar, siendo esta vez la poliubiquitinación de IMD con cadenas K-48 ubiquitina, lo que provoca una degradación de IMD vía proteasoma y por lo tanto la inactivación de la vía (Zhou et al., 2005; Thevenon et al., 2009; Paquette et al., 2010). Por otro lado, se ha propuesto que el complejo SCF (Karin and Ben-Neriah, 2000), formado por las proteínas Slimb, Cullin-3 y SKPA, ubiquitinan a Relish produciendo su degradación vía proteasoma y consecuente inactivación de la vía (Khush et al., 2002).

En esta Tesis se ha estudiado la función del gen *dRYBP* en la respuesta inmune. Se ha descubierto que la proteína dRYBP se expresa en los tejidos inmuno-competentes (Figura 22). Además, varios de los genes moduladores de la penetrancia del fenotipo asociado con la inactivación de *dRYBP* resultaron ser miembros de las vías que regulan esta respuesta en la mosca (Tabla 8). No está claro el porque mutaciones en genes de la respuesta inmune produzcan una modulación en la aparición de ampollas en la mosca, pero quizás este fenotipo este relacionado con procesos inflamatorios.

En *Drosophila* la respuesta inmune conlleva la activación de dos rutas de señalización, dependiendo del patógeno infectante: la ruta de Toll (Figura 7 y (Lemaitre et al., 1995b; Lemaitre et al., 1996) y la ruta de Imd (Figura 8 y (Lemaitre et al., 1995a), que activan la expresión de una serie de genes de respuesta inmune, entre los que se encuentran, los péptidos antimicrobianos, encargados de la eliminación del patógeno (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Aggarwal and Silverman, 2008; Ganesan et al.). Los resultados muestran que la infección por bacterias Gram-negativas en moscas adultas mutantes para *dRYBP* produce un aumento significativo de la expresión de Diptericina (Figura 24 y 25). Además, la sobre-expresión de *dRYBP* produce una inhibición de la expresión de Diptericina (Figura 26). Estos resultados indican que *dRYBP* actúa como un regulador negativo de la vía de Imd.

Los mecanismos por los que *dRYBP* regula la respuesta inmune han resultado no ser a nivel transcripcional (Figura 28 y 29), como se esperaba debido a que *dRYBP* se ha clasificado como una “proteína asociado a PcG/TrxG”. El estudio de las relaciones epistáticas entre *dRYBP* y los componentes de la vía de Imd, sugieren que *dRYBP* puede actuar a varios niveles de la ruta, junto con IMD y Relish (Figura 30 y 33).

¿Cómo modula *dRYBP* la ruta de Imd? Varios son los resultados y las observaciones que me llevan a proponer que *dRYBP* actúa a varios niveles en la ruta de Imd, como una proteína adaptadora de Ubiquitina para reprimir la respuesta inmune (Figura 51). Primero, *dRYBP* contiene en su N-terminal un dominio de ubiquitinación conservado por el cual *dRYBP* puede ubiquitinarse y/o interactuar con proteínas ubiquitinadas (Figura 12 y (Arrigoni et al., 2006). Segundo, experimentos de espectrometría de masas realizados en el laboratorio para descubrir las proteínas que interactúan con *dRYBP* en extractos nucleares embrionarios (Simón R. sin publicar) indican que *dRYBP* interactúa con las proteínas que forman el complejo E2 de ubiquitinación de Imd, es decir, con Bendless, Effete, y Uev1a (Mascot Score 31, 55 y 56 respectivamente, (Simón R. sin publicar), y con dos proteínas del complejo SCF (SKPA y Cullin-3 (SKPA y Cullin-3 (Mascot Score 64 y 46) (Simón R. sin publicar)). Tercero y muy importantemente, los resultados del análisis epistático indican que, *dRYBP* actúa a nivel de Imd y a nivel de Relish/SkpA (Figura 30, 33 y 34).

En este modelo (Figura 51), *dRYBP* funciona a dos niveles donde la ubiquitinación se ha o bien demostrado o bien propuesto. A nivel de Imd en la ubiquitinación de IMD por cadenas K-63 ubiquitina, para activar la cascada, participan las proteínas del complejo E2 formado por Bendless, Effete y Uev1a, y la E3-ubiquitin ligasa IAP2 ((The-

venon et al., 2009; Paquette et al., 2010)). Además, IMD también se des-ubiquitina y se vuelve a poliubiquitinar con cadenas K-48 ubiquitina, lo que induce una degradación de IMD (Thevenon et al., 2009). Es en este proceso de ubiquitinación para degradar a IMD es donde actuaría dRYBP junto con el complejo E2 formado por Bendless, Effete y Uev1a y SKPA como E3 Ubiquitin-ligasa.

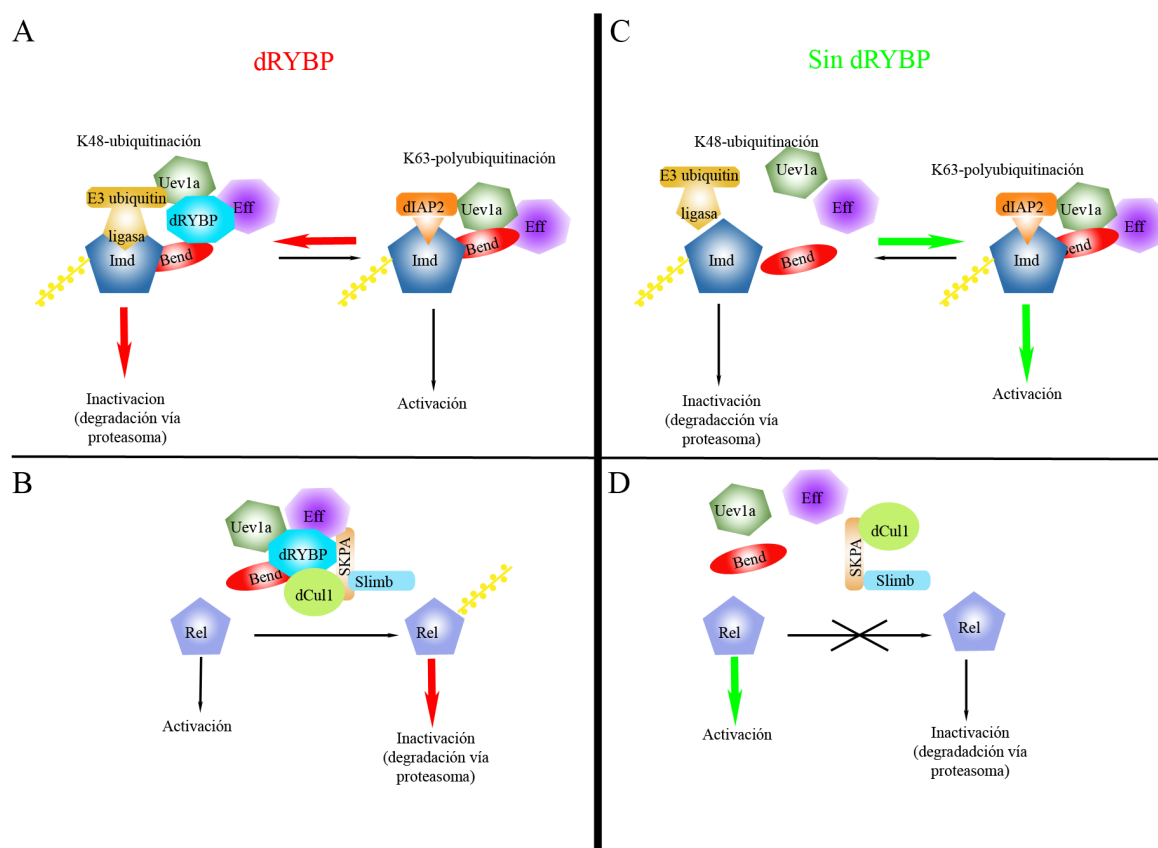


Figura 51. Modelo del mecanismo de actuación de dRYBP en el control negativo de la respuesta inmune en *Drosophila*. En el panel de la izquierda se muestra la función que la proteína dRYBP tendría en el proceso de (A) ubiquitinación de IMD (Zhou et al., 2005; Paquette et al., 2010) y (B) en la ubiquitinación putativa de Relish (Khush et al., 2002). En el panel de la derecha se muestra el efecto que tendría la ausencia de dRYBP en el control negativo de la respuesta inmune, (C) a nivel de la ubiquitinación de IMD y (D) a nivel de la putativa ubiquitinación de Relish. El equilibrio entre activación/inactivación de la vía vendría determinado por la presencia de dRYBP en el complejo de ubiquitinación tanto a nivel de Relish como a nivel de IMD (ver texto para explicación).

Por otro lado, se ha propuesto que Relish sea ubiquitinado, para degradarlo vía proteasoma, y que esta ubiquitinación es dependiente del complejo SCF, formado por SKPA, Slimb y dCul (Khush et al., 2002). En este nivel, dRYBP podría estar actuando junto con las proteínas del complejo E2 formado por Bendless, Effete y Uev1a y SKPA como E3-ubiquitin ligasa (Figura 51). La demostración de este modelo, situaría dRYBP en el proceso de regulación negativa de la respuesta inmune y ampliaría el “network” de actuación de ésta proteína.

4. Regulación de la expresión de dRYBP mediada por microRNAs

La proteína dRYBP, al igual que las proteínas PcG y trxG, se expresa ubicua y nuclearmente a lo largo de todo el desarrollo de *Drosophila* (Riley et al., 1987; Bejarano et al., 2005), lo que sugiere que su expresión no está controlada por regiones *cis*-reguladoras espacio-temporales. Sin embargo, muchos de los genes diana de estas proteínas, por ejemplo el gen *engrailed*, se expresan con patrones espaciales y temporales muy determinados (Busturia and Morata, 1988; Moazed and O'Farrell, 1992), lo que indica que la actividad bioquímica de estas proteínas y, quizás la regulación “fina” de sus niveles de expresión podría determinar el mantenimiento epigenético de la expresión génica.

Variaciones en los niveles de expresión de la proteína dRYBP producen fenotipos que ponen de manifiesto la importancia del control de sus niveles de expresión para el desarrollo y la supervivencia de la mosca (Figura 15, (Gonzalez et al., 2008; Gonzalez and Busturia, 2009)). La hipótesis de trabajo en esta Tesis, fue que la expresión del gen *dRYBP* podría estar mediada por microRNAs, por lo que se analizó su 3'UTR y se encontró, bio-informáticamente, que el 3'UTR de dRYBP puede estar regulado por 33 microRNAs (Tabla 9). Algunos de ellos, se predice que se unen con mayor complementaridad que otros (Figura 36 y 37). Se eligió estudiar el efecto de los microRNAs: *miR-7*, *miR-284*, *miR-304*, *miR-306* y *miR-iab-4*. La sobre expresión de los microRNAs: *miR-7*, *miR-284* y *miR-306* producen una disminución del tamaño del ala (Figura 38, 39 y 40), sugiriendo que altos niveles de estos microRNAs podrían estar implicados en el control de la proliferación o de la apoptosis mediante el mantenimiento de los niveles de expresión de genes involucrados en estos procesos, entre ellos *dRYBP*. Bajos niveles de expresión de *dRYBP* producen alas de tamaño reducido (Figura 15 (Gonzalez et al., 2008)), pero aún no está claro que ésta disminución sea debida a fallos en proliferación, apoptosis o a una combinación de ambos. Sin embargo, altos niveles de dRYBP, también producen disminución del tamaño del ala e inducen apoptosis en los discos imaginales de ala y halterio (Figura 50 y (Gonzalez and Busturia, 2009)).

Es cada vez más evidente que los microRNAs tienen una función muy importante en el control de la apoptosis manteniendo el balance entre la muerte y la vida celular mediante su regulación de genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos (Loffler et al., 2007) (Hermeking, 2010), y este balance es crucial en el mantenimiento de la homeostasis celular. Debido a esta función de los microRNAs, se está proponiendo su uso en el desarrollo de terapias moleculares para combatir enfermedades humanas. Los niveles

de expresión de la proteína RYBP/DEDAF, se han encontrado alterados en diversas patologías humanas, entre ellas el cáncer (Sanchez-Beato et al., 2004; Sanchez-Beato et al., 2006; Seitz et al., 2011). Muy interesantemente, sus altos niveles de expresión inducen apoptosis exclusivamente en células transformadas pero no en células normales (Danen-van Oorschot et al., 2004). Los mecanismos por los cuales esto ocurre, no están esclarecidos, pero bien podría ser que en las células transformadas los niveles de algunos de los microRNAs que regulan RYBP/DEDAF estén alterados, promoviendo variación en sus niveles de expresión y por tanto promoviendo la apoptosis en estas células. De hecho, el tratamiento con LAQ824, inhibidor de las histonas deacetilasas, en dosis pro-apoptóticas en la línea celular SKBr3 de cáncer de mama, produce cambios significativos en los niveles de microRNAs, entre ellos del *hsa-mir-27a* (Scott et al., 2006). Además, la inactivación del *hsa-miR-27a* en estas células tratadas con LAQ824 revierte el aumento de los niveles de expresión de RYBP/DEDAF demostrando la relación entre estos dos eventos (Scott et al., 2006). El trabajo de esta Tesis ha puesto de manifiesto que la expresión de *dRYBP* está fuertemente regulado por microRNAs (Figura 36, 37 y 42 y Tabla 9) y establece las bases para el trabajo futuro dirigido no solo al descubrimiento de los mecanismos de regulación en *Drosophila* sino también en sus homólogos en vertebrados, lo que permite estudiar el papel de esta regulación en el desarrollo normal y en el desarrollo patológico de los organismos.

En esta Tesis se ha estudiado en más profundidad la función de *miR-7* en la regulación de la expresión de *dRYBP*. Se eligió este microRNA entre los múltiples que putativamente regulan la expresión de *dRYBP*, por su conservación filogenética (Figura 36A y B) y porque los homólogos de *dRYBP* en otros organismos también pueden ser regulados por este microRNA (Figura 36C). De esta forma, las conclusiones de este trabajo podrían tener relevancia en el entendimiento de estos procesos en otros organismos. Trabajos anteriores describiendo la función de *miR-7* en *Drosophila*, se han centrado en el análisis de su función en el desarrollo del disco imaginal de ojo (Li and Carthew, 2005), en el control de la especificación de los órganos sensoriales (Li et al., 2009), en la formación del ovario (Pek et al., 2009) y muy recientemente en su papel en el desarrollo de la glándula linfática (Tokusumi et al., 2011). En esta Tesis, se ha estudiado la función de *miR-7* en el desarrollo del disco imaginal de ala. Se ha descubierto que *miR-7* se expresa de una forma homogénea en el disco pero sin embargo tiene una expresión discreta y muy débil en las células adyacentes al borde (también conocidas como “non bounday cells”) del eje dorso/ventral del disco (Figura 41).

El control del tamaño del ala viene determinado por las vías de señalización de Notch y de Wingless que, no solo promueven que el ala crezca sino que también promueven que el ala pare de crecer cuando ha alcanzado su tamaño. El borde dorso/ventral tiene la función de organizar el crecimiento del primordio del disco de ala y se postula que Notch y Wingless son responsables de ésta actividad organizadora (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993). Temprano en el desarrollo, el disco de ala se empieza a dividir en los compartimentos dorsales y ventrales mediante la expresión y función de Apterous (Figura 3 (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993)), y son las interacciones entre las células dorsales y ventrales las que promueven la activación de la vía de Notch en las células del borde (también conocidas como “boundary cells”). Durante el tercer estadio larvario, la actividad de Notch induce la expresión de Wingless en las “boundary cells” y, ahora, son las interacciones entre las “boundary” y “non boundary cells” las que mantienen la actividad de Notch y la expresión de Wingless. Más tarde en el desarrollo del ala, las células del borde paran el ciclo celular y definen la zona de no proliferación celular (ZNC) (O’Brochta and Bryant, 1985). Se ha demostrado que las vías de Notch y Wg controlan el ciclo celular (la transición G1-S), en el ala mediante mecanismos de represión a través de la regulación de la expresión de *d-Myc* y *bantam* (Herranz et al., 2008). Asimismo, en las células del borde la activación de la vía de Notch activa Wingless que difunde a las células adyacentes y por tanto promoviendo la expresión de los efectores de Wg, como Senseless, en las “non boundary cells”. Además, en las células del borde, al activarse la vía de Notch, y por tanto de sus efectores como Cut, se reprime la vía de wingless y se para el crecimiento en estas células (Figura 52 y (Herranz et al., 2008; Herranz and Milan, 2008)).

En esta Tesis se ha mostrado que la falta de función de *miR-7* afecta la formación del borde dorso/ventral, ya que en estas condiciones se produce la sobre-expresión de Cut (Figura 48) pero, sin embargo, la expresión de Senseless, aunque afectada en su patrón, no parece estar afectada en sus niveles (Figura 48). Además la falta de función de *miR-7* produce alas de tamaño reducido, pero las células de la triple fila (marcador morfológico en el ala adulta de las células del borde o “boundary cells”), están relativamente normales (Figura 43). Por otro lado, los altos niveles de expresión de *miR-7* reprimen la expresión de Senseless y de Cut (Figura 49), produciendo un ala pequeña en la que el borde dorso/ventral desaparece. Estos resultados, sugieren un modelo, que aunque muy preliminar, podría servir de hipótesis de trabajo para esclarecer la función de *miR-7* y de dRYBP (ver más adelante), en el crecimiento del ala. En este modelo (Figura 52), *miR-7* se expresa en las “non boundary cells” (Figura 41), y esta expresión es

activada por Wingless, o por sus efectores, durante el establecimiento del borde dorso/ventral. Por otro lado, se sabe que los niveles de expresión de algunos de los efectores de Notch, como Enhancer of Split, son reprimidos por *miR-7* (Stark et al., 2003; Lai et al., 2005). Así, en este modelo, para que tenga lugar un apropiado crecimiento del ala, bien en su proliferación o en su parada de proliferación, la actividad de la vía de Wingless activaría la expresión de *miR-7* que, a su vez, reprimiría la expresión de Notch en las “non boundary cells” permitiendo que el ala crezca hasta alcanzar su tamaño final (Figura 52).

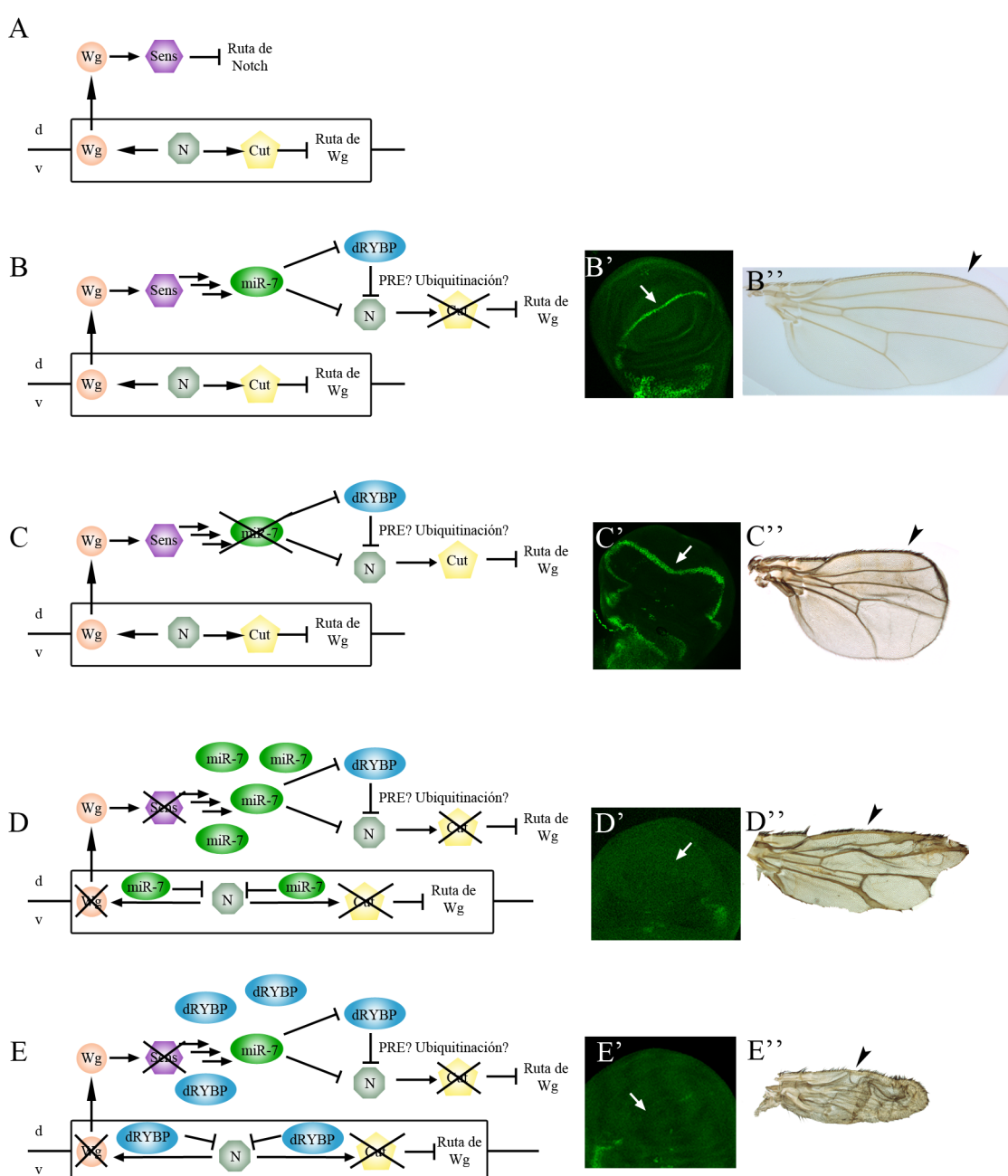


Figura 52. Modelo de actuación de dRYBP y *miR-7* en el control del tamaño del ala. (A) Esquema simplificado de las interacciones moleculares que tienen lugar en las células del borde ("boundary cells", enmarcadas en un rectángulo negro) y las células adyacentes al borde (non boundary cells) que activan la vía de Wingless (wg) para promover la represión de la vía de Notch en estas células. (B) Modelo de actuación del *miR-7* y de dRYBP en este proceso. Se hipotetiza que los efectores de la vía de Wg (como Senseless) activarían la expresión de *miR-7*, que disminuye los niveles de dRYBP y/o Notch, que en última instancia reprime la expresión de Cut, permitiendo la activación/ mantenimiento de la vía de Wg en las células adyacentes al borde. La represión que dRYBP ejerce sobre Notch o sus efectores podría ser mediada a través de su interacción con PREs (Polycomb response elements) localizados en estos genes o mediante procesos de ubiquitinación para degradación vía proteasoma (B') Disco imaginal de ala mostrando que Cut se expresa en las células del borde, en un rango de dos o tres células, pero no en las células adyacentes al borde. (B'') Ala adulta, la flecha indica las células de la triple fila del borde dorso/ventral. (C) Falta de función de *miR-7*. En ausencia de *miR-7*, Cut no se reprime, por lo que no se permite la activación/ mantenimiento de la vía de Wg y por lo tanto el ala no crece o para de crecer antes de que alcance su tamaño final. (C') Disco imaginal de ala *Dfexu¹/ miR-7^{Δ1}*. La expresión de Cut se amplía a un rango de 5 o 6 diámetros celulares, (C'') Ala adulta *Dfexu¹/ miR-7^{Δ1}*. La flecha indica las células de la triple fila. Nótese el disminuido tamaño del ala. (D) Altos niveles de *miR-7*. En las células del borde, altos niveles de *miR-7* reprimen a Notch, impidiendo, por un lado la activación de wg y su difusión a las células adyacentes por lo que la expresión de Senseless esta reprimida (Figura 48). Por otro lado también en las células del borde, se impide la activación de Cut lo que permite la activación de la vía de Wg. En las células adyacentes al borde también se reprime Notch permitiendo la activación de la vía de Wg. Tanto en las células del borde como en las células adyacentes al borde la activación de la vía de wg esta comprometida (D') Disco *sdgal>UAS miR-7* mostrando la ausencia de expresión de Cut. (C') Ala adulta *sdgal4>UAS miR-7* mostrando un tamaño reducido y defectos en la triple fila (flecha). Los defectos de engrosamiento de venas son debido al efecto en la expresión de Notch. (E) Altos niveles de dRYBP. Los efectos en las células del borde y las células adyacentes al borde son similares a los que ocurre con altos niveles de *miR-7* (E') Disco de ala *sdgal4>UAS dRYBP* mostrando la ausencia de expresión de Cut en las células del borde (E'') Ala adulta *sdgal4>UAS dRYBP* mostrando un tamaño reducido y defectos en la formación de la triple fila (Flecha)

¿Como se integraría dRYBP en este modelo? Hemos mostrado que *miR-7* regula los niveles de expresión de dRYBP (Figura 42), y además que la inactivación de dRYBP produce un ala de tamaño reducido (Figura 15 y (Gonzalez et al., 2008)), cuyo borde dorso/ventral no parece estar afectado (Figura 15). Por otro lado, los altos niveles de dRYBP reprimen la expresión de Cut (figura 50) produciendo, además de apoptosis (Figura 50 y (Gonzalez and Busturia, 2009), un ala pequeña y con el borde dorso/ventral comprometido (Figura 52E''). La reducción en el tamaño del ala debido a los altos niveles de expresión de dRYBP no solo es debido a la apoptosis ya que la sobre-expresión conjunta del inhibidor de apoptosis p35 y dRYBP no rescata totalmente el fenotipo del ala adulta (Simón R. et al. sin publicar (Gonzalez and Busturia, 2009). De nuevo, los resultados de esta Tesis sugieren un modelo que sirve como hipótesis de trabajo para analizar la función de *miR-7* y de dRYBP en la regulación del crecimiento del ala. En este modelo (Figura 52), *miR-7* reprime los niveles de expresión de dRYBP que a su vez reprime los niveles de expresión de Notch. La represión de Notch mediada por dRYBP podría tener lugar epigenéticamente mediante su interacción con el PRE (Polycomb Response element) que reside en el gen de Notch ((Classen et al., 2009) Inma González et al. sin publicar) o bien, actuando como una proteína adaptadora de ubiquitina mediando la ubiquitinación/ desubiquitinación de alguno de los efectores de la vía de Notch. En cualquiera de los casos, el estudio de estos mecanismos permitirán descubrir la relación entre los microRNAs y la regulación epigenética.

CONCLUSIONES

Conclusiones:

1. La proteína dRYBP mantiene el estado transcripcional génico de sus genes diana durante el desarrollo de *Drosophila*, mediante su interacción con los Polycomb Response Elements (PREs.)
2. El gen *polyhomeotic* (ph) y el gen *pleiohomeotic* (pho), ambos del grupo Polycomb, participan en la hematopoyesis en *Drosophila* regulando la proliferación y/o la diferenciación de las “Crystal cells”. Bajos niveles de PHO producen una disminución en el número de “Crystal cells”, pero sin embargo tanto bajo como altos niveles de PH producen un aumento en el número de “Crystal cells”.
3. El gen *dRYBP* participa en la hematopoyesis de *Drosophila* regulando el número total de hemocitos mediante su control en la proliferación y/o apoptosis de los mismos.
4. El gen *dRYBP*, que se expresa en los tejidos inmuno-competentes, actúa en la respuesta inmune innata de *Drosophila*. En condiciones de infección bacteriana, el gen *dRYBP* no regula la vía de Toll, pero sin embargo inhibe la respuesta inmune mediada por la ruta de Imd.
5. La proteína dRYBP no regula transcripcionalmente la expresión de los componentes de la vía de Imd.
6. La proteína dRYBP actúa junto con SKPA para inhibir la respuesta inmune. La represión puede tener lugar a varios niveles de la ruta de Imd: a nivel de la proteína IMD y a nivel de la proteína Relish.
7. Los altos niveles de expresión de los *miR-7*, *miR-284* y *miR-306* producen una disminución en el tamaño del ala de *Drosophila*.
8. Los niveles de expresión de *dRYBP* están regulados por el *miR-7*, que se expresa en las células del borde dorso/ventral del disco imaginal de ala.
9. Los altos niveles de dRYBP, inhiben la ruta de Notch en el borde dorso/ventral.
10. El *microRNA-7* controla la proliferación del disco imaginal de ala a través de su regulación de la vía Notch en el borde dorso ventral para controlar su tamaño.

BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, K., Rus, F., Vriesema-Magnuson, C., Erturk-Hasdemir, D., Paquette, N. and Silverman, N. (2008) 'Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway', *PLoS Pathog* 4(8): e1000120.

Aggarwal, K. and Silverman, N. (2008) 'Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response', *BMB Rep* 41(4): 267-77.

Akasaka, T., Tsuji, K., Kawahira, H., Kanno, M., Harigaya, K., Hu, L., Ebihara, Y., Nakahata, T., Tetsu, O., Taniguchi, M. et al. (1997) 'The role of mel-18, a mammalian Polycomb group gene, during IL-7-dependent proliferation of lymphocyte precursors', *Immunity* 7(1): 135-46.

Arrigoni, R., Alam, S. L., Wamstad, J. A., Bardwell, V. J., Sundquist, W. I. and Schreiber-Agus, N. (2006) 'The Polycomb-associated protein Rybp is a ubiquitin binding protein', *FEBS Lett* 580(26): 6233-41.

Ashburner, M. (1989) '*Drosophila*: A Laboratory Handbook', *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Ashida, M. (1990) 'The prophenoloxidase cascade in insect immunity', *Res Immunol* 141(9): 908-10.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R. and Pasquinelli, A. E. (2005) 'Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation', *Cell* 122(4): 553-63.

Baker, R. G., Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2011) 'NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease', *Cell Metab* 13(1): 11-22.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P. and Izaurralde, E. (2006) 'mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes', *Genes & development* 20(14): 1885-98.

Bejarano, F. and Busturia, A. (2004) 'Function of the Trithorax-like gene during *Drosophila* development', *Dev Biol* 268(2): 327-41.

Bejarano, F., Gonzalez, I., Vidal, M. and Busturia, A. (2005) 'The *Drosophila* RYBP gene functions as a Polycomb-dependent transcriptional repressor', *Mech Dev* 122(10): 1118-29.

Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M. et al. (2004) 'The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes', *Genetics* 167(2): 761-81.

Belvin, M. P. and Anderson, K. V. (1996) 'A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway', *Annual review of cell and developmental biology* 12: 393-416.

Bidla, G., Dushay, M. S. and Theopold, U. (2007) 'Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger', *J Cell Sci* 120(Pt 7): 1209-15.

Bidla, G., Lindgren, M., Theopold, U. and Dushay, M. S. (2005) 'Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae', *Dev Comp Immunol* 29(8): 669-79.

Biemar, F., Zinzen, R., Ronshaugen, M., Sementchenko, V., Manak, J. R. and Levine, M. S. (2005) 'Spatial regulation of microRNA gene expression in the *Drosophila* embryo', *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(44): 15907-11.

Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. and Zavortink, M. (1994) 'The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene ex-

- pression in the developing wing of *Drosophila*', *Development* 120(7): 1805-15.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', *Development* 118(2): 401-15.
- Breen, T. R. and Duncan, I. M. (1986) 'Maternal expression of genes that regulate the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol* 118(2): 442-56.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2003) 'bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*', *Cell* 113(1): 25-36.
- Brower, D. L. (1986) 'Engrailed gene expression in *Drosophila* imaginal discs', *Embo J* 5(10): 2649-56.
- Brown, J. L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M. L. and Kassis, J. A. (1998) 'The *Drosophila* Polycomb group gene *pleiohomeotic* encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1', *Mol Cell* 1(7): 1057-64.
- Bushati, N. and Cohen, S. M. (2007) 'microRNA functions', *Annual review of cell and developmental biology* 23: 175-205.
- Busturia, A. and Bienz, M. (1993) 'Silencers in abdominal-B, a homeotic *Drosophila* gene', *Embo J* 12(4): 1415-25.
- Busturia, A., Lloyd, A., Bejarano, F., Zavortink, M., Xin, H. and Sakonju, S. (2001) 'The MCP silencer of the *Drosophila* Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression', *Development* 128(11): 2163-73.
- Busturia, A. and Morata, G. (1988) 'Ectopic expression of homeotic genes caused by the elimination of the Polycomb gene in *Drosophila* imaginal epidermis', *Development* 104(4): 713-20.
- Busturia, A., Wightman, C. D. and Sakonju, S. (1997) 'A silencer is required for maintenance of transcriptional repression throughout *Drosophila* development', *Development* 124(21): 4343-50.
- Cadigan, K. M. (2002) 'Regulating morphogen gradients in the *Drosophila* wing', *Semin Cell Dev Biol* 13(2): 83-90.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G. (1996) 'Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*', *Science* 274(5285): 252-5.
- Cao, R., Tsukada, Y. and Zhang, Y. (2005) 'Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing', *Mol Cell* 20(6): 845-54.
- Cao, R. and Zhang, Y. (2004) 'The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3', *Current opinion in genetics & development* 14(2): 155-64.
- Cerenius, L. and Soderhall, K. (2004) 'The prophenoloxidase-activating system in invertebrates', *Immunol Rev* 198: 116-26.
- Chang, Y. L., King, B. O., O'Connor, M., Mazo, A. and Huang, D. H. (1995) 'Functional reconstruction of trans regulation of the Ultrabithorax promoter by the products of two antagonistic genes, trithorax and Polycomb', *Molecular and cellular biology* 15(12): 6601-12.
- Chekulaeva, M. and Filipowicz, W. (2009) 'Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells', *Current opinion in cell biology* 21(3): 452-60.
- Chen, W., White, M. A. and Cobb, M. H. (2002) 'Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway', *J Biol Chem* 277(51): 49105-10.
- Chiba, S. (1998) 'Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemogenesis', *Int J Hematol* 68(4): 343-53.

Choe, K. M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D. and Anderson, K. V. (2002) 'Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*', *Science* 296(5566): 359-62.

Classen, A. K., Bunker, B. D., Harvey, K. F., Vaccari, T. and Bilder, D. (2009) 'A tumor suppressor activity of *Drosophila* Polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling', *Nat Genet* 41(10): 1150-5.

Corbo, J. C. and Levine, M. (1996) 'Characterization of an immunodeficiency mutant in *Drosophila*', *Mech Dev* 55(2): 211-20.

Crozatier, M. and Meister, M. (2007) '*Drosophila* haematopoiesis', *Cell Microbiol* 9(5): 1117-26.

Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A. and Meister, M. (2004) 'Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier*', *PLoS Biol* 2(8): E196.

Danen-van Oorschot, A. A., Voskamp, P., Seelen, M. C., van Miltenburg, M. H., Bolk, M. W., Tait, S. W., Boesen-de Cock, J. G., Rohn, J. L., Borst, J. and Noteborn, M. H. (2004) 'Human death effector domain-associated factor interacts with the viral apoptosis agonist Apoptin and exerts tumor-preferential cell killing', *Cell Death Differ* 11(5): 564-73.

de Celis, J. F., Garcia-Bellido, A. and Bray, S. J. (1996) 'Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc', *Development* 122(1): 359-69.

De Gregorio, E., Spellman, P. T., Rubin, G. M. and Lemaitre, B. (2001) 'Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays', *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12590-5.

Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1993) 'Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*', *Cell* 75(4): 741-52.

Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S. et al. (2007) 'A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*', *Nature* 448(7150): 151-6.

Dominguez-Gimenez, P., Brown, N. H. and Martin-Bermudo, M. D. (2007) 'Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium', *J Cell Sci* 120(Pt 6): 1061-71.

Duchow, H. K., Brechbiel, J. L., Chatterjee, S. and Gavis, E. R. (2005) 'The nanos translational control element represses translation in somatic cells by a Bearded box-like motif', *Dev Biol* 282(1): 207-17.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. and Izaurralde, E. (2007) 'P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways', *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(1): 9-22.

Eulalio, A., Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2008) 'Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing', *Cell* 132(1): 9-14.

Evans, C. J., Hartenstein, V. and Banerjee, U. (2003) 'Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis', *Dev Cell* 5(5): 673-90.

Fabian, M. R., Sonenberg, N. and Filipowicz, W. (2010) 'Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs', *Annu Rev Biochem* 79: 351-79.

Faucheux, M., Roignant, J. Y., Netter, S., Charollais, J., Antoniewski, C. and Theodore, L. (2003) 'batman Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor', *Molecu-*

lar and cellular biology 23(4): 1181-95.

Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C. and Hoffmann, J. A. (1994) 'Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides', *J Biol Chem* 269(52): 33159-63.

Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A. and White, K. (1999) 'Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*', *Science* 284(5422): 1991-4.

Ganesan, S., Aggarwal, K., Paquette, N. and Silverman, N. (2011) 'NF-kappaB/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster*', *Curr Top Microbiol Immunol* 349: 25-60.

Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y. and Reinberg, D. (2012) 'PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes', *Mol Cell* 45(3): 344-56.

Garcia, E., Marcos-Gutierrez, C., del Mar Lorente, M., Moreno, J. C. and Vidal, M. (1999) 'RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1', *Embo J* 18(12): 3404-18.

Garcia-Bellido, A. and Merriam, J. R. (1971) 'Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol* 24(1): 61-87.

Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (2001) '*Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis', *Dev Cell* 1(4): 503-14.

Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A. J. and Schier, A. F. (2006) 'Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs', *Science* 312(5770): 75-9.

Gonzalez, I., Aparicio, R. and Busturia, A. (2008) 'Functional characterization of the dRYBP gene in *Drosophila*', *Genetics* 179(3): 1373-88.

Gonzalez, I. and Busturia, A. (2009) 'High levels of dRYBP induce apoptosis in *Drosophila* imaginal cells through the activation of reaper and the requirement of tri thorax, dredd and dFADD', *Cell Res* 19(6): 747-57.

Gonzalez, I., Simon, R. and Busturia, A. (2009) 'The Polyhomeotic protein induces hyperplastic tissue overgrowth through the activation of the JAK/STAT pathway', *Cell Cycle* 8(24): 4103-11.

Goto, A., Kadowaki, T. and Kitagawa, Y. (2003) '*Drosophila* hemolymph gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects', *Dev Biol* 264(2): 582-91.

Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D. and Royet, J. (2002) 'The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein', *Nature* 416(6881): 640-4.

Grabbe, C., Zervas, C. G., Hunter, T., Brown, N. H. and Palmer, R. H. (2004) 'Focal adhesion kinase is not required for integrin function or viability in *Drosophila*', *Development* 131(23): 5795-805.

Gutierrez, L., Oktaba, K., Scheuermann, J. C., Gambetta, M. C., Ly-Hartig, N. and Muller, J. (2011) 'The role of the histone H2A ubiquitinase Sce in Polycomb repression', *Development* 139(1): 117-27.

Haynie, J. L. (1983) 'The maternal and zygotic roles of the gene Polycomb in

embryonic determination in *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol* 100(2): 399-411.

Hazelrigg, T., Watkins, W. S., Marcey, D., Tu, C., Karow, M. and Lin, X. R. (1990) 'The exuperantia gene is required for *Drosophila* spermatogenesis as well as anteroposterior polarity of the developing oocyte, and encodes overlapping sex-specific transcripts', *Genetics* 126(3): 607-17.

He, L. and Hannon, G. J. (2004) 'MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation', *Nat Rev Genet* 5(7): 522-31.

Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M. S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M. and Hultmark, D. (1999) 'Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*', *Mol Cell* 4(5): 827-37.

Hermeking, H. (2010) 'The miR-34 family in cancer and apoptosis', *Cell Death Differ* 17(2): 193-9.

Herranz, H. and Milan, M. (2008) 'Signalling molecules, growth regulators and cell cycle control in *Drosophila*', *Cell Cycle* 7(21): 3335-7.

Herranz, H., Perez, L., Martin, F. A. and Milan, M. (2008) 'A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the *Drosophila* wing', *Embo J* 27(11): 1633-45.

Hidalgo, A. (1994) 'Three distinct roles for the engrailed gene in *Drosophila* wing development', *Curr Biol* 4(12): 1087-98.

Holland, P. M., Suzanne, M., Campbell, J. S., Noselli, S. and Cooper, J. A. (1997) 'MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous', *J Biol Chem* 272(40): 24994-8.

Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W. and Klapper, R. (2003) 'The two origins of hemocytes in *Drosophila*', *Development* 130(20): 4955-62.

Huang, L., Ohsako, S. and Tanda, S. (2005) 'The lesswright mutation activates Rel-related proteins, leading to overproduction of larval hemocytes in *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol* 280(2): 407-20.

Inui, M., Martello, G. and Piccolo, S. (2010) 'MicroRNA control of signal transduction', *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(4): 252-63.

Jack, J., Dorsett, D., Delotto, Y. and Liu, S. (1991) 'Expression of the cut locus in the *Drosophila* wing margin is required for cell type specification and is regulated by a distant enhancer', *Development* 113(3): 735-47.

Jung, S. H., Evans, C. J., Uemura, C. and Banerjee, U. (2005) 'The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis', *Development* 132(11): 2521-33.

Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) 'Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity', *Annu Rev Immunol* 18: 621-63.

Karlsson, C., Korayem, A. M., Scherfer, C., Loseva, O., Dushay, M. S. and Theopold, U. (2004) 'Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot', *J Biol Chem* 279(50): 52033-41.

Kennison, J. A. and Tamkun, J. W. (1988) 'Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(21): 8136-40.

Khush, R. S., Cornwell, W. D., Uram, J. N. and Lemaitre, B. (2002) 'A ubiquitin-proteasome pathway represses the *Drosophila* immune deficiency signaling cascade', *Curr Biol* 12(20): 1728-37.

Kiger, J. A., Jr., Natzle, J. E. and Green, M. M. (2001) 'Hemocytes are essential for wing maturation in *Drosophila melanogaster*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10190-5.

- Kim, M., Lee, J. H., Lee, S. Y., Kim, E. and Chung, J. (2006) 'Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44): 16358-63.
- Kleino, A., Myllymaki, H., Kallio, J., Vanha-aho, L. M., Oksanen, K., Ulvila, J., Hultmark, D., Valanne, S. and Ramet, M. (2008) 'Pirk is a negative regulator of the *Drosophila* Imd pathway', *J Immunol* 180(8): 5413-22.
- Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymaki, H., Enwald, H., Stoven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D. et al. (2005) 'Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway', *Embo J* 24(19): 3423-34.
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M. and Muller, J. (2006a) 'A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities', *Genes & development* 20(9): 1110-22.
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M. and Muller, J. (2006b) 'A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities', *Genes & development* 20(9): 1110-22.
- Kondo, T., Yokokura, T. and Nagata, S. (1997) 'Activation of distinct caspase-like proteases by Fas and reaper in *Drosophila* cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(22): 11951-6.
- Konuma, T., Oguro, H. and Iwama, A. (2010) 'Role of the polycomb group proteins in hematopoietic stem cells', *Development, growth & differentiation* 52(6): 505-16.
- Krzemien, J., Crozatier, M. and Vincent, A. (2010) 'Ontogeny of the *Drosophila* larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism', *Int J Dev Biol* 54(6-7): 1117-25.
- Kurucz, E., Zettervall, C. J., Sinka, R., Vilmos, P., Pivarcsi, A., Ekengren, S., Hegedus, Z., Ando, I. and Hultmark, D. (2003) 'Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2622-7.
- Lai, E. C., Tam, B. and Rubin, G. M. (2005) 'Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs', *Genes & development* 19(9): 1067-80.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. and Meister, M. (2001) 'Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*', *Dev Biol* 230(2): 243-57.
- Lavine, M. D. and Strand, M. R. (2002) 'Insect hemocytes and their role in immunity', *Insect Biochem Mol Biol* 32(10): 1295-309.
- Lawrence, P. (1992) 'The Making of a fly. The genetics of Animal Design.', *Oxford Blackwell Scientific Publications*.
- Lazareva, A. A., Roman, G., Mattox, W., Hardin, P. E. and Dauwalder, B. (2007) 'A role for the adult fat body in *Drosophila* male courtship behavior', *PLoS genetics* 3(1): e16.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V. and Banerjee, U. (2000) 'Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors', *Science* 288(5463): 146-9.
- Lebestky, T., Jung, S. H. and Banerjee, U. (2003) 'A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis', *Genes & development* 17(3): 348-53.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993) 'The *C. elegans* heterochronic

gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell* 75(5): 843-54.

Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007) 'The host defense of *Drosophila melanogaster*', *Annu Rev Immunol* 25: 697-743.

Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1995a) 'A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense', *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(21): 9465-9.

Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1995b) 'Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*', *Embo J* 14(3): 536-45.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996) 'The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults', *Cell* 86(6): 973-83.

Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M. and Lemaitre, B. (2000) 'The *Drosophila* caspase *Dredd* is required to resist gram-negative bacterial infection', *EMBO reports* 1(4): 353-8.

Leulier, F., Vidal, S., Saigo, K., Ueda, R. and Lemaitre, B. (2002) 'Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for dFADD in the regulation of the antibacterial response in *Drosophila* adults', *Current biology : CB* 12(12): 996-1000.

Levashina, E. A., Ohresser, S., Lemaitre, B. and Imler, J. L. (1998) 'Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide *metchnikowin*', *J Mol Biol* 278(3): 515-27.

Lhocine, N., Ribeiro, P. S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., Tenev, T., Lemaitre, B., Gstaiger, M., Meier, P. and Leulier, F. (2008) 'PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling', *Cell Host Microbe* 4(2): 147-58.

Li, X. and Carthew, R. W. (2005) 'A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye', *Cell* 123(7): 1267-77.

Li, X., Cassidy, J. J., Reinke, C. A., Fischboeck, S. and Carthew, R. W. (2009) 'A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development', *Cell* 137(2): 273-82.

Loffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., Stocsits, C., Hackermuller, J., Kretzschmar, A. K., Burger, R., Gramatzki, M., Blumert, C., Bauer, K. et al. (2007) 'Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer', *Blood* 110(4): 1330-3.

Lu, Y., Wu, L. P. and Anderson, K. V. (2001) 'The antibacterial arm of the *Drosophila* innate immune response requires an IkappaB kinase', *Genes & development* 15(1): 104-10.

Magli, M. C., Largman, C. and Lawrence, H. J. (1997) 'Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation', *J Cell Physiol* 173(2): 168-77.

Malynn, B. A. and Ma, A. (2010) 'Ubiquitin makes its mark on immune regulation', *Immunity* 33(6): 843-52.

Mandal, L., Banerjee, U. and Hartenstein, V. (2004) 'Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm', *Nat Genet* 36(9): 1019-23.

Mandal, L., Martinez-Agosto, J. A., Evans, C. J., Hartenstein, V. and Banerjee, U.

- (2007) 'A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors', *Nature* 446(7133): 320-4.
- Martin-Perez, D., Piris, M. A. and Sanchez-Beato, M. (2010) 'Polycomb proteins in hematologic malignancies', *Blood* 116(25): 5465-75.
- Martinez, A. M., Schuettengruber, B., Sakr, S., Janic, A., Gonzalez, C. and Cavalli, G. (2009) 'Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling', *Nat Genet* 41(10): 1076-82.
- Meister, M. (2004) 'Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence', *Curr Opin Immunol* 16(1): 10-5.
- Micchelli, C. A., Rulifson, E. J. and Blair, S. S. (1997) 'The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate', *Development* 124(8): 1485-95.
- Minakhina, S. and Steward, R. (2006) 'Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes', *Genetics* 174(1): 253-63.
- Minakhina, S., Tan, W. and Steward, R. (2011) 'JAK/STAT and the GATA factor Pannier control hemocyte maturation and differentiation in *Drosophila*', *Dev Biol* 352(2): 308-16.
- Moazed, D. and O'Farrell, P. H. (1992) 'Maintenance of the engrailed expression pattern by Polycomb group genes in *Drosophila*', *Development* 116(3): 805-10.
- Mozer, B. A. and Dawid, I. B. (1989) 'Cloning and molecular characterization of the trithorax locus of *Drosophila melanogaster*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(10): 3738-42.
- Muller, J. and Kassis, J. A. (2006) 'Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*', *Current opinion in genetics & development* 16(5): 476-84.
- Murphy, T. D. (2003) '*Drosophila* skipA, a component of SCF ubiquitin ligases, regulates centrosome duplication independently of cyclin E accumulation', *J Cell Sci* 116(Pt 11): 2321-32.
- Murray, M. A., Fessler, L. I. and Palka, J. (1995) 'Changing distributions of extracellular matrix components during early wing morphogenesis in *Drosophila*', *Dev Biol* 168(1): 150-65.
- Naitza, S., Rosse, C., Kappler, C., Georgel, P., Belvin, M., Gubb, D., Camonis, J., Hoffmann, J. A. and Reichhart, J. M. (2002) 'The *Drosophila* immune defense against gram-negative infection requires the death protein dFADD', *Immunity* 17(5): 575-81.
- Nappi, A. J. and Vass, E. (1993) 'Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions', *Pigment Cell Res* 6(3): 117-26.
- Netter, S., Faucheux, M. and Theodore, L. (2001) 'Developmental dynamics of a polyhomeotic-EGFP fusion in vivo', *DNA Cell Biol* 20(8): 483-92.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M. (1996) 'A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the *Drosophila* wing', *Development* 122(11): 3477-85.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M. (1997) 'Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing', *Development* 124(4): 871-80.
- Nolo, R., Abbott, L. A. and Bellen, H. J. (2000) 'Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*', *Cell* 102(3): 349-62.
- O'Brochta, D. A. and Bryant, P. J. (1985) 'A zone of non-proliferating cells at a lineage restriction boundary in *Drosophila*', *Nature* 313(5998): 138-41.

Olofsson, B. and Page, D. T. (2005) 'Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity', *Dev Biol* 279(1): 233-43.

Olsen, P. H. and Ambros, V. (1999) 'The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation', *Dev Biol* 216(2): 671-80.

Ono, R., Nosaka, T. and Hayashi, Y. (2005) 'Roles of a trithorax group gene, MLL, in hematopoiesis', *International journal of hematology* 81(4): 288-93.

Owusu-Ansah, E. and Banerjee, U. (2009) 'Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation', *Nature* 461(7263): 537-41.

Paquette, N., Broemer, M., Aggarwal, K., Chen, L., Husson, M., Erturk-Hasdemir, D., Reichhart, J. M., Meier, P. and Silverman, N. (2010) 'Caspase-mediated cleavage, IAP binding, and ubiquitination: linking three mechanisms crucial for *Drosophila* NF-kappaB signaling', *Mol Cell* 37(2): 172-82.

Park, I. K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., Morrison, S. J. and Clarke, M. F. (2003) 'Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells', *Nature* 423(6937): 302-5.

Parker, R. and Sheth, U. (2007) 'P bodies and the control of mRNA translation and degradation', *Mol Cell* 25(5): 635-46.

Pek, J. W., Lim, A. K. and Kai, T. (2009) '*Drosophila* maelstrom ensures proper germline stem cell lineage differentiation by repressing microRNA-7', *Dev Cell* 17(3): 417-24.

Pichaud, F., Treisman, J. and Desplan, C. (2001) 'Reinventing a common strategy for patterning the eye', *Cell* 105(1): 9-12.

Pickart, C. M. and Eddins, M. J. (2004) 'Ubiquitin: structures, functions, mechanisms', *Biochimica et biophysica acta* 1695(1-3): 55-72.

Posakony, L. G., Raftery, L. A. and Gelbart, W. M. (1990) 'Wing formation in *Drosophila melanogaster* requires decapentaplegic gene function along the anterior-posterior compartment boundary', *Mech Dev* 33(1): 69-82.

Qiu, P., Pan, P. C. and Govind, S. (1998) 'A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis', *Development* 125(10): 1909-20.

Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B. and Ezekowitz, R. A. (2002) 'Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*', *Nature* 416(6881): 644-8.

Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P. and Randsholt, N. B. (2002) 'Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene', *Genetics* 162(3): 1259-74.

Riley, P. D., Carroll, S. B. and Scott, M. P. (1987) 'The expression and regulation of Sex combs reduced protein in *Drosophila* embryos', *Genes & development* 1(7): 716-30.

Ringrose, L. and Paro, R. (2007) 'Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity', *Development* 134(2): 223-32.

Rizki, R. M. and Rizki, T. M. (1984) 'Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp', *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(19): 6154-8.

Ronshaugen, M., Biemar, F., Piel, J., Levine, M. and Lai, E. C. (2005) 'The *Drosophila* microRNA iab-4 causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings', *Genes & development* 19(24): 2947-52.

Ruby, J. G., Stark, A., Johnston, W. K., Kellis, M., Bartel, D. P. and Lai, E. C. (2007)

'Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs', *Genome Res* 17(12): 1850-64.

Rutschmann, S., Jung, A. C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J. A. and Ferrandon, D. (2000) 'Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response', *Nat Immunol* 1(4): 342-7.

Rutschmann, S., Kilinc, A. and Ferrandon, D. (2002) 'Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*', *J Immunol* 168(4): 1542-6.

Ryu, J. H., Kim, S. H., Lee, H. Y., Bai, J. Y., Nam, Y. D., Bae, J. W., Lee, D. G., Shin, S. C., Ha, E. M. and Lee, W. J. (2008) 'Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*', *Science* 319(5864): 777-82.

Sanchez-Beato, M., Sanchez, E., Garcia, J. F., Perez-Rosado, A., Montoya, M. C., Fraga, M., Artiga, M. J., Navarrete, M., Abaira, V., Morente, M. et al. (2004) 'Abnormal PcG protein expression in Hodgkin's lymphoma. Relation with E2F6 and NFkappaB transcription factors', *J Pathol* 204(5): 528-37.

Sanchez-Beato, M., Sanchez, E., Gonzalez-Carrero, J., Morente, M., Diez, A., Sanchez-Verde, L., Martin, M. C., Cigudosa, J. C., Vidal, M. and Piris, M. A. (2006) 'Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays', *Mod Pathol* 19(5): 684-94.

Sanicola, M., Sekelsky, J., Elson, S. and Gelbart, W. M. (1995) 'Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of decapentaplegic and patched expression by engrailed', *Genetics* 139(2): 745-56.

Sanson, B. (2001) 'Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation', *EMBO reports* 2(12): 1083-8.

Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S. J. and Shimizu, K. (2011) 'MicroRNAs and epigenetics', *Febs J* 278(10): 1598-609.

Sawa, C., Yoshikawa, T., Matsuda-Suzuki, F., Delehouzee, S., Goto, M., Watanabe, H., Sawada, J., Kataoka, K. and Handa, H. (2002) 'YEAFF1/RYPB and YAF-2 are functionally distinct members of a cofactor family for the YY1 and E4TF1/hGABP transcription factors', *J Biol Chem* 277(25): 22484-90.

Scherfer, C., Karlsson, C., Loseva, O., Bidla, G., Goto, A., Havemann, J., Dushay, M. S. and Theopold, U. (2004) 'Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method', *Curr Biol* 14(7): 625-9.

Schmitter, D., Filkowski, J., Sewer, A., Pillai, R. S., Oakeley, E. J., Zavolan, M., Svoboda, P. and Filipowicz, W. (2006) 'Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells', *Nucleic acids research* 34(17): 4801-15.

Schuettengruber, B. and Cavalli, G. (2009) 'Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice', *Development* 136(21): 3531-42.

Schuettengruber, B. and Cavalli, G. (2010) 'The DUBle life of polycomb complexes', *Dev Cell* 18(6): 878-80.

Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G. (2007) 'Genome regulation by polycomb and trithorax proteins', *Cell* 128(4): 735-45.

Schuettengruber, B., Ganapathi, M., Leblanc, B., Portoso, M., Jaschek, R., Tolhuis, B., van Lohuizen, M., Tanay, A. and Cavalli, G. (2009) 'Functional anatomy of polycomb and trithorax chromatin landscapes in *Drosophila* embryos', *PLoS Biol* 7(1): e13.

Schuettengruber, B., Martinez, A. M., Iovino, N. and Cavalli, G. (2011) 'Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active', *Nature reviews. Molecu-*

lar cell biology 12(12): 799-814.

Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V. (2007) 'Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes', *Nat Rev Genet* 8(1): 9-22.

Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V. (2008) 'Polycomb complexes and epigenetic states', *Current opinion in cell biology* 20(3): 266-73.

Scott, G. K., Mattie, M. D., Berger, C. E., Benz, S. C. and Benz, C. C. (2006) 'Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition', *Cancer Res* 66(3): 1277-81.

Seitz, V., Thomas, P. E., Zimmermann, K., Paul, U., Ehlers, A., Joosten, M., Dimitrova, L., Lenze, D., Sommerfeld, A., Oker, E. et al. (2011) 'Classical Hodgkin's lymphoma shows epigenetic features of abortive plasma cell differentiation', *Haematologica* 96(6): 863-70.

Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R. L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D. and Maniatis, T. (2003) 'Immune activation of NF-kappaB and JNK requires Drosophila TAK1', *J Biol Chem* 278(49): 48928-34.

Simon, J., Chiang, A., Bender, W., Shimell, M. J. and O'Connor, M. (1993) 'Elements of the Drosophila bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products', *Dev Biol* 158(1): 131-44.

Sinenko, S. A. and Mathey-Prevot, B. (2004) 'Increased expression of Drosophila tetraspanin, Tsp68C, suppresses the abnormal proliferation of ytr-deficient and Ras/Raf-activated hemocytes', *Oncogene* 23(56): 9120-8.

Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D. C., Wilson, C., Davis, R. J. and Ip, Y. T. (1996) 'A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in Drosophila', *Genes & development* 10(21): 2745-58.

Soderhall, K. and Cerenius, L. (1998) 'Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity', *Curr Opin Immunol* 10(1): 23-8.

Sondergaard, L. (1993) 'Homology between the mammalian liver and the Drosophila fat body', *Trends in genetics : TIG* 9(6): 193.

Sorrentino, R. P., Melk, J. P. and Govind, S. (2004) 'Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in Drosophila', *Genetics* 166(3): 1343-56.

Stark, A., Brennecke, J., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2003) 'Identification of Drosophila MicroRNA targets', *PLoS Biol* 1(3): E60.

Stoven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y. and Hultmark, D. (2000) 'Activation of the Drosophila NF-kappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage', *EMBO reports* 1(4): 347-52.

Strigini, M. and Cohen, S. M. (1999) 'Formation of morphogen gradients in the Drosophila wing', *Semin Cell Dev Biol* 10(3): 335-44.

Tabas, I. (2010) 'Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis', *Nat Rev Immunol* 10(1): 36-46.

Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T. and Kurata, S. (2002) 'Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in Drosophila larvae', *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13705-10.

Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J. A. and Imler, J. L. (2002) 'Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections', *Nat Immunol* 3(1): 91-7.

Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H. et al. (2012) 'RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3', *Cell* 148(4): 664-78.

Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A. and Hartenstein, V. (1994) 'Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*', *Development* 120(7): 1829-37.

Thevenon, D., Engel, E., Avet-Rochex, A., Gottar, M., Bergeret, E., Tricoire, H., Benaud, C., Baudier, J., Taillebourg, E. and Fauvarque, M. O. (2009) 'The *Drosophila* ubiquitin-specific protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signaling', *Cell Host Microbe* 6(4): 309-20.

Tokusumi, T., Tokusumi, Y., Hopkins, D. W., Shoue, D. A., Corona, L. and Schulz, R. A. (2011) 'Germ line differentiation factor Bag of Marbles is a regulator of hematopoietic progenitor maintenance during *Drosophila* hematopoiesis', *Development*.

Turner, M. D., Chaudhry, A. and Nedjai, B. (2012) 'Tumour necrosis factor receptor trafficking dysfunction opens the TRAPS door to pro-inflammatory cytokine secretion', *Biosci Rep* 32(2): 105-12.

van Lohuizen, M. (1999) 'The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease', *Current opinion in genetics & development* 9(3): 355-61.

Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M. and Lemaitre, B. (2001) 'Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses', *Genes & development* 15(15): 1900-12.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S. and Zhang, Y. (2004) 'Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing', *Nature* 431(7010): 873-8.

Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T., Brickey, W. J. and Ting, J. P. (2011) 'Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling', *Nat Immunol* 12(5): 408-15.

Wicker, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Hultmark, D., Samakovlis, C. and Hoffmann, J. A. (1990) 'Insect immunity. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the dipterecin family of immune peptides', *J Biol Chem* 265(36): 22493-8.

Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993) 'Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*', *Cell* 75(5): 855-62.

Wilkinson, F., Pratt, H. and Atchison, M. L. (2010) 'PcG recruitment by the YY1 REPO domain can be mediated by Yaf2', *Journal of cellular biochemistry* 109(3): 478-86.

Williams, M. J. (2007) '*Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity', *J Immunol* 178(8): 4711-6.

Woo, C. J., Kharchenko, P. V., Daheron, L., Park, P. J. and Kingston, R. E. (2010) 'A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness', *Cell* 140(1): 99-110.

Wood, W. and Jacinto, A. (2007) '*Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking', *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(7): 542-51.

Wu, S. C., Liao, C. W., Pan, R. L. and Juang, J. L. (2012) 'Infection-Induced Intesti-

nal Oxidative Stress Triggers Organ-to-Organ Immunological Communication in *Drosophila*', *Cell Host Microbe* 11(4): 410-7.

Zaidman-Remy, A., Herve, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M. S., Blanot, D., Oh, B. H., Ueda, R., Mengin-Lecreulx, D. and Lemaitre, B. (2006) 'The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection', *Immunity* 24(4): 463-73.

Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G. (1996) 'Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient', *Cell* 87(5): 833-44.

Zettervall, C. J., Anderl, I., Williams, M. J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I. and Hultmark, D. (2004) 'A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation', *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39): 14192-7.

Zhou, R., Silverman, N., Hong, M., Liao, D. S., Chung, Y., Chen, Z. J. and Maniatis, T. (2005) 'The role of ubiquitination in *Drosophila* innate immunity', *J Biol Chem* 280(40): 34048-55.

Zhuang, Z. H., Sun, L., Kong, L., Hu, J. H., Yu, M. C., Reinach, P., Zang, J. W. and Ge, B. X. (2006) '*Drosophila* TAB2 is required for the immune activation of JNK and NF-kappaB', *Cell Signal* 18(7): 964-70.

ANEXOS

Anexo 1: Lista de genes (CGs y nombre) usados en la búsqueda de genes que modulasen la penetrancia del fenotipo de falta de función de *dRYBP*

Número CG	Name	Porcentaje de moscas con ampollas	Número CG	Name	Porcentaje de moscas con ampollas
2991	CG2991	0,0	1954	Protein C kinase 98E	76,2
5576	immune deficiency	0,0	8825	glaikit	76,5
1830	Phosphorylase kinase γ	0,0	16705	Spatzle-Processing Enzyme	76,5
32369	CG32369	0,0	1659	unc-119	76,9
3009	CG3009	0,0	3019	suppressor of white-apricot	76,9
31640	CG34380	0,0	8522	Helix loop helix protein 106	76,9
31640	CG34380	0,0	32246	CG32246	76,9
14445	CG14445	5,3	1483	Microtubule-associated protein 205	77,1
3225	CG3225	5,9	12919	eiger	77,3
11312	inscuteable	6,3	7793	Son of sevenless	77,3
1102	Melanization Protease 1	6,7	9697	PGRP-SB2	77,8
3114	erect wing	6,7	9739	frizzled 2	78,6
6186	Transferrin 1	7,1	7219	CG7219	78,9
5462	scribbled	8,3	5097	Metallothionein C	78,9
10605	caupolican	10,0	2926	2926	80,0
12199	kekkon5	11,1	15283	CG15283	80,0
1049	CTP:phosphocholine cytidyltransferase 1	11,8	6667	dorsal	80,0
7356	CG7356	12,1	4580	CG4580	80,0
1888	CG1888	12,5	31522	CG31522	80,0
6531	wengen	14,3	31956	polypeptide GalNAc transferase 4	80,0
2078	Myd88	15,2	7596	Salivary gland secretion 5	80,0
10082	CG10082	15,6	1981	Thd1	81,0
9218	smooth	16,7	7109	microtubule star	81,0
9398	king tubby	17,6	11765	Peroxiredoxin 2540	81,3
4889	wingless	18,2	18497	split ends	81,3
7532	CG7532	18,8	33193	salvador	81,8
5974	pelle	20,0	3939	CG3939	81,8
4757	CG4757	20,0	5786	peter pan	81,8
1637	Cg1637	20,0	1691	IGF-II mRNA-binding protein	81,8
7738	CG7738	22,2	3249	yu	81,8
9586	CG9586	23,1	3714	CG3714	81,8
12058	multi sex combs	23,7	6889	taranis	81,8
5170	Dodeca-satellite-binding protein 1	25,0	11371	debra	81,8
14941	extra sec combs	25,0	6659	CG6659	81,8
14704	Peptidoglycan recognition protein LB	26,7	8846	thor	82,9
4655	CG4655	26,7	9928	CG9928	83,3
13422	CG13422	27,3	1804	kek6	83,3
7759	CG7759	27,3	7863	dream	83,3
31668	CG31668	27,3	14959	CG14959	83,9
3123	CG3123	28,6	9631	CG9631	84,2

6303	Bruce	28,6	2168	Ribosomal protein S3A	84,2
6687	CG6687	29,0	31632	senseless-2	84,6
10335	Porphobilinogen synthase	29,4	3540	Cyp4d14	84,6
31782	CG31782	30,0	7788	Ice	84,6
4812	Ser8	30,0	16765	pasilla	84,6
18743	Heat-shock-protein-70Ab	30,0	3258	asense	84,6
4276	arouser	30,0	9616	CG9616	84,6
3127	Phosphoglycerate kinase	31,3	10019	CG10019	84,6
32816	CG32816	32,1	8166	unc-5	84,6
12780	CG12780	33,3	14360	Odorant receptor 88a	85,0
12630	tiptop	33,3	3059	NTPase	85,4
33260	CG33260	34,6	14619	CG14619	85,7
3759	CG3759	35,7	6429	CG6429	85,7
17180	CG17160	36,4	10176	CG10176	85,7
15138	beat-IIIc	36,4	9330	CG9330	85,7
11637	CG11637	38,1	9453	Serine protease inhibitor 4	85,7
10756	TBP-associated factor 13	38,5	3176	CG3176	85,7
4079	TBP-associated factor 11	38,5	10693	slowpoke	86,7
9660	toucan	38,5	2972	CG2972	86,7
5370	Death caspase-1	40,0	9539	Sec61 α	86,7
11811	CG11811	40,5	4025	CG2025	87,0
12078	CG12078	41,2	30022	CG30022	87,1
16952	CG16952	41,7	1274	thioredoxin peroxidase 2	87,5
3156	CG3156	41,7	32406	CG32406	87,5
10475	Jonah 65Ai	42,9	3399	cappuccino	87,5
13168	CG13168	44,4	3771	a6	87,5
8579	Jonah 44E	45,5	4408	CG4408	87,9
5133	Dorsocross1	45,5	6986	CG6986	88,0
9162	CG9162	45,5	7702	CG7702	88,2
5465	Mediator complex subunit 16	46,2	1464	eyeless	88,2
4432	Peptidoglycan recognition protein LC	0,0	4559	Imaginal disc growth factor 3	88,9
3604	CG3604	48,3	4267	CG4267	89,4
6414	CG6414	48,6	7122	RhoGAP16F	89,5
14027	Turandot M	50,0	8464	HtrA2	89,5
3972	Cytochrome P450-4g1	50,0	8965	CG8965	90,0
12161	CG12161	50,0	18179	CG18179	90,0
8129	CG8129	50,0	3541	piopio	90,0
31363	Jupiter	50,0	18525	Serine protease inhibitor 5	90,0
17174	ACXB	50,0	10677	CG10677	90,0
4427	cabut	50,0	10236	Laminin A	90,3
9021	CG9021	51,9	8853	CG8853	90,9
9042	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase	52,9	2615	I κ B kinase-like 2	90,9
7082	CG7082	52,9	31692	fructose-1,6-bisphosphatase	91,7
9495	Sex comb on midleg	53,8	32119	CG32119	91,7
7524	Src oncogene at 64B	54,2	14939	CG14939	91,7
6524	Chorion protein 19	54,5	8421	Aspartyl β -hydroxylase	91,7
7079	CG7079	54,5	31822	CG31822	91,7
18550	yellow-f	54,8	17870	14-3-3 ζ	91,7

8732	lethal (2) 44DEa	55,6	3106	CG3106	91,7
3165	CG3165	56,5	2157	CG2157	91,7
14033	Cg14033	56,5	15629	CG15629	92,0
4892	CG4892	56,5	9486	CG9486	92,3
7437	mushroom-body expressed	56,8	14902	death executioner caspase related to Apopain/Yama	92,3
7443	CG7443	57,1	13897	CG13897	92,3
2977	innexin 7	58,3	1693	tweetz	92,3
30354	CG30354	58,6	5055	bazooka	92,9
3926	Serine pyruvate aminotransferase	59,1	16978	CG16978	92,9
3445	pleiohomeotic like	59,1	31825	CG31825	93,3
1046	zerknüllt	59,4	12065	CG12065	93,3
18176	deflated	59,4	17888	PAR-domain protein 1	93,8
18106	Immune induced molecule 2	60,0	6137	aubergine	93,8
30079	CG60079	60,0	31815	CG31815	93,8
32100	CG32100	60,9	9379	blisterly	94,1
31693	CG31639	60,9	6715	KP78a	94,1
13323	CG13323	61,5	32783	CG32783	94,1
1968	CG1968	61,9	11387	cut	94,1
32345	CG32345	63,2	30091	CG30091	94,1
11727	CG11727	63,2	7708	CG7708	94,1
17360	CG17360	63,6	2368	pipsqueak	94,7
7115	CG7115	64,3	4068	Cg4068	95,0
11842	CG11842	64,3	15427	turtle	95,7
9169	FucTD	64,3	4536	inactive	95,8
3299	vinculin	64,3	10619	tailup	96,2
30026	CG30026	64,7	2984	Protein phosphatase 2C	97,1
2939	sloppy paired 2	64,7	10363	Thiolester containing protein IV	100,0
30034	CG30034	64,7	4238	CG4238	100,0
4587	CG4587	65,0	7633	CG7633	100,0
9238	CG9238	65,0	7103	PDGF- and VEGF-related factor 1	100,0
5235	CG5235	65,0	6514	Troponin C at 25D	100,0
17600	CG17600	65,0	12296	klumpfuss	100,0
1624	CG1624	65,4	1167	Ras oncogene at 64B	100,0
3327	Early gene at 23	66,7	15353	CG15353	100,0
12154	ocelliess	66,7	2525	Hus1-like	100,0
3104	CG3104	66,7	11992	Relish	36,0
7367	CG7367	66,7	6622	Protein C kinase 53E	100,0
12402	CG12402	66,7	6502	Enhancer of Zeste	100,0
7228	peste	67,4	11527	tiggrin	100,0
6172	ventral nervous system defective	68,0	3132	Ect3	100,0
3989	ade5	68,2	14746	PGRP-SC1a	100,0
9537	Daxx-like protein	68,4	3027	pyd3	100,0
9239	B4	68,8	15365	CG15365	100,0
7503	Connectin	68,8	10325	Abdominal-A	100,0
10543	CG10543	68,8	7598	CG7598	100,0
17896	CG17896	69,0	1696	lethal (1) G0269	100,0
7254	Glycogen phosphorylase	69,2	1469	Ferritin 2 light chain homologue	100,0
30355	CG30355	69,2	14745	PGRP-SC 2	100,0

10719	brain tumor	70,0	12130	CG12130	100,0
12696	CG12696	70,0	5730	Annexin IX	100,0
17697	frizzled	70,0	5675	X11L	100,0
9258	nervana 1	70,0	5488	BarH2	100,0
6898	Zinc/iron regulated transporter-related protein 3	70,0	8836	Cuticular protein 49Ad	100,0
6965	methuselah-like 5	70,4	11186	twin of eyeless	100,0
13263	Cytochrome c distal	71,1	11709	Peptidoglycan recognition protein SA	100,0
4437	Peptidoglycan recognition protein LF	72,0	4145	Collagen type IV	100,0
14022	CG14022	72,2	13780	PDGF- and VEGF-related factor 2	100,0
5550	CG5550	72,2	3304	CG34394	100,0
9645	CG9645	72,2	8742	Guanylyl cyclase at 76C	100,0
2189	Deformed	72,7	7052	Thiolester containing protein II	100,0
7994	CG7994	72,7	8049	Btk family kinase at 29A	100,0
11459	CG11459	72,7	7958	tonalli	33,3
5648	Prosa6T	72,7	3886	Posterior sex combs	20,0
18405	Sema-1a	72,7	4201	Ikk	59,0
5174	CG5174	72,7	7417	Tab-2	33,0
8498	CG8498	73,3	5680	basket	23,0
17100	CG17100	73,3	8400	caspar	21,0
3066	Serine protease 7	73,3	12297	dFADD	13,0
7875	transient receptor potential	74,1	7486	Dredd	2,0
15414	CG15414	74,2	18492	TAK1	0,0
5793	CG5793	74,2			
9171	CG9171	75,0			
8677	CG8677	75,0			
31324	CG31324	75,0			
13324	CG13324	75,0			
8871	Jonah 25Biii	75,0			
18180	CG18180	75,0			
4293	CG4293	75,0			
16713	CG16713	75,9			
15065	CG15065	76,0			
7727	β amyloid protein precursor-like	76,0			
2125	cubitus interruptus	76,2			

Anexo 2: Lista de genes letales cuya inactivación con la línea *enGal4* produce letalidad

CG	Name	CG	Nombre
3314	Ribosomal protein L7A	7085	lethal (2) s5379
6831	rhea	4094	lethal (1) G0255
1913	α -Tubulin at 84B	3075	CG3075
12101	Heat shock protein 60	8127	Ecdysone-induced protein 75B
6884	Mediator complex subunit 11	8211	CG8211
9603	CG9603	12217	Protein phosphatase V
32193	CG32193	31366	Heat-shock-protein-70Aa
15319	nejire	9973	CG9973
9113	AP-1 γ	31364	lethal (3) neo38
10021	brother of odd with entrails limited	12225	Spt6
1921	sprouty	17743	pleiohomeotic
11990	Hyrax	12202	Nat1
8974	CG8974	5738	lola like
10687	Asparaginyl-tRNA synthetase	11901	Ef1 γ
14750	Vacuolar protein sorting 25	9998	U2 small nuclear riboprotein auxiliary factor 50
15016	mitochondrial ribosomal protein S6	11092	CG11092
6998	cut up	11861	guftagu
2941	CG2941	15112	enabled
18783	Kruppel homolog 1	2969	ABC transporter expressed in trachea
7417	TAK1-associated Binding Protein2	9022	Oligosaccharyltransferase 48kD subunit
8887	absent, small, or homeotic discs 1	10479	CG10479
7583	C-terminal Binding Protein	15056	CG15056
12399	Mothers against dpp	6930	lethal (3) neo38
2028	Casein kinase I α	18102	shibire
1771	multiple edematous wings	8068	Suppressor of variegation 2-10
10967	Autophagy-specific gene 1	1264	labial
17342	LK6	10231	Phosphodiesterase 11
8639	Cirl	1897	Drop
11201	CG11201	15442	Ribosomal protein L27A
15636	Umbrea	12085	poly U binding factor 68kD
32067	simjang	2216	Ferritin 1 heavy chain homologue
1886	ATP7	17559	doughnut on 2
7128	TBP-associated factor 8	14938	crooked legs
4013	Smrter	7123	Laminin B1
2168	Ribosomal protein S3A	7597	CG7597
3918	CG3918	1621	CG1621
2974	CG2974	11228	hippo
32130	starvin	5123	Wrinkled
3629	Distal-less	15382	CG15382
6450	lava lamp	14589	CG14589
6620	IpII-aurora-like kinase	9080	CG9080
10423	Ribosomal protein S27	4453	Nup153
5163	Transcription-factor-IIA-S	18740	moira
7392	Connector of kinase to AP-1	7803	yeste
9594	Chd3	3595	spaghetti squash
7776	Enhancer of Polycomb	10418	CG10418
CG	Nombre	CG	Nombre

6883	tracheless	8426	lethal (2) NC136
32374	CG32374	10585	CG10585
32211	TBP-associated factor 6	13109	taiman
1768	diaphanous	6663	CG6663
2656	CG2656	6768	DNA polymerase ϵ
2968	lethal (1) G0230	10293	held out wings
1560	mysospheroid	18412	polyhomeotic proximal
1725	discs large 1	17358	TBP-associated factor 12
12052	longitudinals lacking	7954	steamer duck
3977	Copper transporter 1A	7766	CG7766
5123	Wrinkled	4114	expanded
9375	Ras oncogene at 85D	2762	U-shaped
3165	CG3165	2530	corto
3664	Rab-protein 5	8624	melted
32062	CG32062	1133	odd paired
8184	CG8184	3905	Suppressor of zeste 2
8506	Rabenosyn	8922	Ribosomal protein S5a
4141	Pi3K92E	12676	echinoid
3869	Mitochondrial assembly regulatory factor	7178	wings up A
9733	CG9733	14351	CG14351
6246	nubbin	3727	dreadlocks
11265	CG11265	3542	CG3542
1725	discs large 1	6500	beadex
8651	trithorax	9653	brinker
5595	Sex Comb Extra	31605	Basigin
8491	kohtalo	1412	RhoGAP19D
18104	arginase	3862	Cg3862
9056	CG9096	15598	Osiris 17
8086	CG8086	8896	18 wheeler
9351	falafel	8833	CG8833
3161	Vacuolar H ⁺ ATPase 16kD subunit	10881	CG10881
17903	Cytochrome c proximal	9946	eIF-2 α
7664	cropped	3434	CG3434
3224	CG32247	16788	RNA-binding protein S1
1664	small bristles	4022	CG4022
14957	CG14957	18155	Cg18155
18273	CG18273	2859	TBP-associated factor 10
4898	Tropomyosin 1	2151	Thioredoxin reductase-1
2843	Cwc25	10798	diminutive
7227	CG7227	3291	pacman
8923	meiotic 218	7636	mitochondrial ribosomal protein L2
30426	eggless	3696	kismet
9075	Eukaryotic initiation factor 4a	5461	bunched
30023	sprite	7279	Lipase 1
7704	TBP-associated factor 5	1677	CG1677
9623	inflated	1490	ubiquitin-specific protease 7
1765	Ecdysone receptor	2979	Yolk protein 2
10033	foraging	8095	scab
3100	b6	12113	lethal (1) G0095
CG	Nombre	CG	Nombre

3702	CG3702	8404	Sox box protein 15
12072	warts	16903	CG16903
5014	Vap-33-1	5444	TBP-associated factor 4
2865	CG2865	2109	mitochondrial ribosomal protein L44
5799	defective proventriculus	11799	Mnf
3758	escargot	6824	ovo
9020	Arginyl-tRNA synthetase		
1759	caudal		
5393	apontic		
10701	Moesin		
2252	female sterile (1) homeotic		
4070	Tis11 homolog		
9346	CG9346		
5953	CG5953		
10908	CG10908		
3638	CG3638		
17964	pangolin		
18414	polyhomeotic proximal		
7039	CG7039		
4527	Sterile20-like kinase		
11648	Abdominal-B		
8293	Inhibitor of apoptosis 2		
1030	Sex combs reduced		
4247	mitochondrial ribosomal protein S10		
9649	CG9649		
7134	cdc14		
2845	pole hole		
5844	CG5844		
3921	CG3921		
10052	Retinal Homeobox		
9936	skuld		
7239	CG7239		
14029	vrlle		
3981	Unc-76		
7467	osa		
1857	necrotic		
12079	CG12079		
10840	eIF5B		
2063	CG2063		
4184	Mediator complex subunit 15		
3929	deltex		
4761	knirps-like		
6639	CG6639		
3352	fat		
31772	CG31772		
6944	Lamin		
6743	Nup107		
1856	tramtrack		
18166	CG18166		

Anexo 3: Predicción de los distintos microRNAs que se unen al 3'UTR de RYBP de ratón y humano según las distintas bases de datos.

PicTar	DIANA LAB	Target Scan Human	Target Scan Mouse
		miR-1ab/206/613	miR-1ab/206/613
miR-7		miR-7/7ab	miR-7/7ab
	miR-9	miR-9/9ab	miR-9/9ab
miR-10a		miR-10abc/10a-5p	miR-10abc/10a-5p
miR-10b			
miR-15a	miR-15a	miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907	miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907
miR-15b	miR-15b		
miR-16	miR-16		
	miR-17	miR-17/17-5p/20ab/20b-5p/93/106ab/427/518a-3p/519d	miR-17/17-5p/20ab/20b-5p/93/106ab/427/518a-3p/519d
miR-19a		miR-19ab	miR-19ab
miR-19b			
	miR-20a		
	miR-20b		
		miR-21/590-5p	
		miR-22/22-3p	
miR-23a	miR-23a	miR-23abc/23b-3p	miR-23abc/23b-3p
	miR-23b		
miR-25			
		miR-26ab/1297/4465	
miR-27a	miR-27a	miR-27abc/27a-3p	miR-27abc/27a-3p
miR-27b	miR-27b		
	miR-29a		
miR-29b	miR-29b	miR-29abcd	miR-29abcd
miR-29c	miR-29c		
		miR-31	
			miR-33ab/33-5p
	miR-93		
miR-103	miR-103	miR-103a/107/107ab	miR-103a/107/107ab
miR-105			
miR-106			
	miR-106a		
	miR-106b		
miR-107	miR-107		
	miR-124	miR-124/124ab/506	miR-124/124ab/506
		miR-125a-3p/1554	
	miR-125a-5p	miR-125a-5p/125b-5p/351/670/4319	miR-125a-5p/125b-5p/670/4319
	miR-125b		
miR-128a	miR-128a	miR-128/128ab	
miR-128b	miR-128b	miR-129-5p/129ab-5p	

	miR-130a	miR-130ac/301ab/301b/301b-3p/454/721/4295/3666	miR-130ac/301ab/301b/301b-3p/454/721/4295/3666
	miR-130b		miR-132/128ab
			miR-132/212/212-3p
		miR-135ab/135a-5p	miR-135ab/135a-5p
		miR-136	
		miR-140/140-5p/876-3p/1244	
	miR-141	miR-141/200a	miR-141/200a
	miR-142-5p		
		miR-148ab-3p/152	miR-148ab-3p/152
		miR-149	
			miR-150/5127
		miR-154/872	
		miR-183	
			miR-184
		miR-186	
		miR-194	
miR-195	miR-195		
		miR-197	
	miR-200a		
		miR-203	
			miR-204/204b/211
		miR-205/205ab	
		miR-208ab/208ab-3p	miR-208ab/208ab-3p
	miR-214	miR-214/761/3619-5p	
			miR-216a
		miR-217	miR-217
	miR-218	miR-218/218a	miR-218/218a
		miR-219-5p/508/508-3p/4782-3p	miR-219-5p/508/508-3p/4782-3p
		miR-223	
	miR-300	miR-300/381/539-3p	
	miR-301		
	miR-301b		
		miR-324-5p	
		miR-328a/328b-3p	
miR-335		miR-335/335-5p	
	miR-340	miR-340-5p	
	miR-34c-3p		
		miR-361-5p	
	miR-369-3p		
	miR-372		
	miR-374a	miR-374ab	
	miR-374b		
		miR-375	
		miR-376abd/376b-3p	
		miR-376c/741-5p	

	miR-381		
		miR-410/344de/344b-1-3p	
		miR-411	
		miR-433	
	miR-450b-5p		
		miR-451	
	miR-452		
	miR-454		
	miR-485-3p		
		miR-488	
		miR-490-3p	
		miR-494	
	miR-495	miR-495/1192	
	miR-497		
	miR-499-5p	miR-499-5p	miR-499-5p
		miR-503	
	miR-506		
	miR-513-3p		
	miR-515-5p		
	miR-517b		
	miR-519a		
	miR-519b-3p		
	miR-519c-3p		
	miR-519d		
	miR-520a-3p		
	miR-520b		
	miR-520c-3p		
	miR-520d-3p		
	miR-520e		
	miR-520g		
	miR-520h		
	miR-523-5p		
		miR-539/539-5p	
	miR-548a-3p		
	miR-548a-5p		
	miR-548b-5p		
	miR-548c-5p		
	miR-548d-3p		
	miR-548d-5p		
	miR-580		
	miR-590-3p	miR-590-3p	
	miR-613		
	miR-636		
	miR-655		
	miR-656		
	miR-659		

		miR-758	
		miR-875-5p	
		miR-876-5p/3167	
	miR-944		

Anexo 4: Lista de genes de *Drosophila* dianas para *miR-7* predichos bioinformaticamente

Nombre	CG	Nombre	CG	Nombre	CG
CG8394	CG8394	CG18549	CG18549	CG14812	CG14812
HLHm5	CG6096	CG4342	CG4342	CG2129	CG2129
Tom	CG5185	CG5044	CG5044	CG32103	CG32103
CG13465	CG13465	CG8861	CG8861	CG3967	CG3967
m4	CG6099	CG9368	CG9368	CG4562	CG4562
bw	CG17632	Act88F	CG5178	CG4670	CG4670
CG14973	CG14973	Cad87A	CG6977	CG5854	CG5854
cpa	CG10540	d	CG10595	CG5890	CG5890
fritz	CG17657	D2R	CG33517	CG7272	CG7272
h	CG6494	da	CG5102	CG8481	CG8481
HLHm3	CG8346	DopR2	CG18741	CG8743	CG8743
iHog	CG9211	elav	CG4262	CG9760	CG9760
lama	CG10645	eRF1	CG5605	CG12488	CG12488
Samuel	CG31868	fax	CG4609	CG13784	CG13784
Tm1	CG4898	fng	CG10580	CG14640	CG14640
CG10444	CG10444	Ggamma1	CG8261	CG14681	CG14681
CG13646	CG13646	Him	CG15064	Sucb	CG10622
CG13908	CG13908	lgs	CG2041	CG14479	CG14479
CG31472	CG31472	LysC	CG9111		
CG4587	CG4587	MED19	CG5546		
CG4685	CG4685	Mhc	CG17927		
abd-A	CG10325	nAcRalpha-34E	CG32975		
Gap1	CG6721	pdm2	CG12287		
CG6700	CG6700	Ppn	CG33103		
dx	CG3929	Ptp10D	CG1817		
aop	CG3166	Rgk2	CG34390		
ss	CG6993	rin	CG9412		
5-HT1B	CG15113	Skeletor	CG33676		
bowl	CG10021	smi21F	CG4710		
cnk	CG6556	SMSr	CG32380		
cos	CG1708	Su(fu)	CG6054		
Fer2	CG5952	Teh1	CG12806		
GATAe	CG10278	CG10338	CG10338		
HLHmgamma	CG8333	CG10882	CG10882		
jbug	CG30092	CG11319	CG11319		
jim	CG11352	CG11665	CG11665		
lmd	CG4677	CG12913	CG12913		
mbc	CG10379	CG1295	CG1295		
p130CAS	CG1212	CG13064	CG13064		
pgant5	CG31651	CG13213	CG13213		
sns	CG33141	CG13466	CG13466		
SRPK	CG8174	CG14372	CG14372		

Functional Characterization of the *dRYBP* Gene in *Drosophila*

Inma González, Ricardo Aparicio and Ana Busturia¹

Centro de Biología Molecular CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Manuscript received October 9, 2007

Accepted for publication May 6, 2008

ABSTRACT

The *Drosophila dRYBP* gene has been described to function as a *Polycomb*-dependent transcriptional repressor. To determine the *in vivo* function of the *dRYBP* gene, we have generated mutations and analyzed the associated phenotypes. Homozygous null mutants die progressively throughout development and present phenotypes variable both in their penetrance and in their expressivity, including disrupted oogenesis, a disorganized pattern of the syncytial nuclear divisions, defects in pattern formation, and decreased wing size. Although *dRYBP* mutations do not show the homeotic-like phenotypes typical of mutations in the *PcG* and *trxG* genes, they enhance the phenotypes of mutations of either the *Sex comb extra* gene (*PcG*) or the *trithorax* gene (*trxG*). Finally, the *dRYBP* protein interacts physically with the *Sex comb extra* and the *Pleiohomeotic* proteins, and the homeotic-like phenotypes produced by the high levels of the *dRYBP* protein are mediated through its C-terminal domain. Our results indicate that the *dRYBP* gene functions in the control of cell identity together with the *PcG*/*trxG* proteins. Furthermore, they also indicate that *dRYBP* participates in the control of cell proliferation and cell differentiation and we propose that its functional requirement may well depend on the robustness of the animal.

PATTERN formation during animal development requires the controlled spatial and temporal regulation of gene expression. Once gene transcriptional states have been established, their maintenance during cellular proliferation is crucial for the normal development of the organism. The *Polycomb* (*PcG*) and the *trithorax* (*trxG*) groups of genes play a pivotal role in this process (for a recent review see SCHUETTENGROBER *et al.* 2007). The *PcG* genes are required for the maintenance of the repressed state while the *trxG* are needed for the maintenance of the active state. The *PcG* and *trxG* genes were first identified in the fly *Drosophila melanogaster*, due to their role in morphogenesis as regulators of homeotic gene expression (LEWIS 1978; JÜRGENS 1985; BREEN and HARTE 1991; for a review see RINGROSE and PARO 2004). However, it is now clear that the *PcG* and *trxG* genes also have relevant roles in other biological processes, such as hematopoiesis, stem cell renewal, control of cell proliferation, and tumorigenesis (VAN DER LUGT *et al.* 1994; VALK-LINGBEEK *et al.* 2004; BROCK and FISHER 2005; FERRES-MARCO *et al.* 2006; MARTINEZ and CAVALLI 2006; SPARMANN and VAN LOHUIZEN 2006).

Central to *PcG*/*trxG* epigenetic-mediated mechanisms is the recruitment and formation of multimeric protein complexes. In *Drosophila*, three major protein complexes containing *PcG* proteins have been isolated. The first identified were the complexes *Polycomb repressive complex 1* (PRC1) (SHAO *et al.* 1999) and

PRC2 (CAO *et al.* 2002; CZERMIN *et al.* 2002; KUZMICHEV *et al.* 2002; MULLER *et al.* 2002). The core of PRC1 includes Polycomb (PC), Posterior sex combs (PSC), the E3 ubiquitin ligase Sex comb extra (SCE), and Polyhomeotic (PH). The core of PRC2 is composed of the histone methyl transferase Enhancer of zeste [E(Z)], Suppressor of zeste 12 [SU(Z)12], Extra sex combs (ESC), and Nurf-55. The third repressive complex, *pleiohomeotic repressor complex* (PHORC), containing the pleiohomeotic (PHO) protein, has recently been isolated from *Drosophila* embryos (KLYMENKO *et al.* 2006). Three *trxG* complexes have been identified: *trithorax acetylation complex* (TAC), NURF, and the SWI/SNF (for reviews see GRIMAUD *et al.* 2006b; SCHWARTZ and PIRROTTA 2007). There are other *PcG*/*trxG* proteins that do not form part of the core of these complexes, but still are associated with them and, therefore, have been classified as *PcG*/*trxG*-associated proteins (OTTE and KWAKS 2003).

While much is known about the roles of the *PcG*/*trxG* proteins in the *Drosophila* morphogenesis, less is known about their role in biological processes such as the control of cellular proliferation and differentiation during development. Mutations in some of the *Drosophila* *PcG*/*trxG* genes cause phenotypes associated with misregulation of cell proliferation. For example, *E(z)* was identified in a screen for essential cell-cycle genes (GATTI and BAKER 1989), and mutations in the *E(z)* gene produce proliferation defects and the appearance of small imaginal discs (PHILLIPS and SHEARN 1990). Furthermore, the corto protein (a centrosomal and chromosomal factor) colocalizes with PSC binding

¹Corresponding author: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, c/Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain. E-mail: abusturia@cbm.uam.es

sites at polytene chromosomes, interacts genetically with PcG mutations, and affects progression through mitosis (KODJABACHIAN *et al.* 1998). Moreover, mutations in the PcG genes *ph*, *Pc*, and *Psc* show segregation defects during syncytial embryonic mitosis (O'DOR *et al.* 2006). Finally, it has been shown recently that the expression of *cyclin A* is directly regulated by the PcG proteins, showing a clear link between these proteins and the control of the cell cycle (MARTINEZ *et al.* 2006).

To define the mechanisms by which PcG/trxG function, the isolation and functional characterization of each component of the complexes is necessary. The murine *RYBP* gene was identified in a two-hybrid screen designed to isolate Ring1A/Ring1B (SCE in *Drosophila*) interacting proteins (GARCIA *et al.* 1999). Because of its interaction with Ring1A, M33, and YY1 (SCE, PC, and PHO, respectively, in *Drosophila*)—all of them key components of the PcG complexes—RYBP was proposed to belong to the PcG of proteins (GARCIA *et al.* 1999). Studies of the murine RYBP gene and protein indicate that the gene has several distinct biological roles and, because the protein can bind to several transcription factors, it has been proposed to function as an adaptor protein (GARCIA *et al.* 1999; TRIMARCHI *et al.* 2001; SAWA *et al.* 2002; SCHLISIO *et al.* 2002). It has been shown that the murine RYBP protein is a novel ubiquitin-binding protein that is itself ubiquitinated. Furthermore, one of its targets appears to be the ubiquitinated histone H2A, which is also a substrate of Ring1 B E3 ubiquitin ligase (ARRIGONI *et al.* 2006). Recently, a BCOR protein complex has been isolated that, together with the RYBP protein, includes a Posterior sex combs homolog, NSPC1, and RNF2, an E3 ligase with H2A mono-ubiquitylation activity (GEARHART *et al.* 2006; SANCHEZ *et al.* 2007). Together these results suggest that the interaction of RYBP and RNF2/Ring1A/SCE may be necessary for the mono-ubiquitylation of H2A (ARRIGONI *et al.* 2006), an essential mechanism for the maintenance of gene expression (WANG *et al.* 2003; DE NAPOLES *et al.* 2004; FANG *et al.* 2004; CAO *et al.* 2005). Finally, RYBP knockout mice exhibited lethality at the early postimplantation stage, suggesting an essential role in survival. No homeotic phenotypes were reported in these mutants, but the lack of RYBP function in the central nervous system (CNS) produced brain overgrowth and disrupted neural tube closure (PIRITY *et al.* 2005).

Previously, we described the identification of the *dRYBP* gene in *Drosophila* (BEJARANO *et al.* 2005). We showed that the dRYBP protein behaves as a *Polycomb*-dependent transcriptional repressor throughout development. Furthermore, we showed that high levels of dRYBP protein produce homeotic-like phenotypes that can be modulated by mutations in PcG/trxG genes. These results suggested that the dRYBP protein could function by recruiting the PcG proteins and, therefore, linked dRYBP to the mechanisms of maintenance of gene expression in *Drosophila*.

We have studied the biological role of *dRYBP* by characterizing the phenotypes associated with *dRYBP* mutations. The phenotypes associated with *dRYBP* mutations are variable both in their expressivity and in their penetrance. *dRYBP* mutations are pleiotropic, producing progressive lethality during development, arrest in the syncytial nuclear divisions, defects in morphogenesis, reduced size of the wings, and cell differentiation defects. Although *dRYBP* mutations alone do not result in homeotic-like phenotypes, they do when in combination with mutations in some PcG and trxG genes. We have found that the dRYBP protein is localized in a nuclear pattern and colocalizes with some of the Polycomb nuclear bodies (BUCHENAU *et al.* 1998; SAURIN *et al.* 1998; NETTER *et al.* 2001; FICZ *et al.* 2005; GRIMAUD *et al.* 2006a). Moreover, the protein is dynamically distributed during the mitotic cycle in the syncytial embryo. Furthermore, the dRYBP protein physically interacts with SCE and PHO proteins. Finally, we also show that the C-terminal domain of dRYBP protein is required to produce the homeotic-like phenotypes. Our results suggest that *dRYBP* participates in the control of cell identity and in the control of cell proliferation and cell differentiation through a direct or an indirect interaction with PcG and trxG proteins.

MATERIALS AND METHODS

***Drosophila* strains and general procedures:** The following mutations were employed: *Pc^c*, *Sce¹*, *pho¹*, *pho^o*, *trx^{E2}*, *Trl¹⁸⁵*, *Trl^{13c}*, *Rpd3¹*, and *Df(1) w^{67/23}* flies (γ^- , w^-) (all described in FlyBase, <http://flybase.bio.indiana.edu/stocks>). The *Df(2R) 58B3-59* (kindly provided by T. L. Orr-Weaver) deletes *dRYBP* and additional genes, and the PC-EGFP transgenic line (kindly provided by R. Paro) reproduces the expression of the Polycomb protein (DIETZEL *et al.* 1999). The recombinant stock *dRYBP¹*, *P[Histone-3:GFP]/CyO* was made using flies containing *P[Histone-3:GFP]* on the second chromosome (provided by S. Aldaz). Genetic interactions between *dRYBP* and PcG/trxG mutations were studied, using stocks containing *P[¹SUPor-¹PCG12190 [KG08683]]* (BELLEN *et al.* 2004) (herein called *dRYBP¹*) in the second chromosome and one of the PcG/trxG mutations on the third or the fourth chromosome. The number of flies examined ranged from 60 to 104. Homeotic transformations observed in these interaction studies appear to be very sensitive to crowding conditions, and therefore care was taken to avoid such conditions. Somatic heat-shocked induced clones were generated by crossing female *yw¹¹¹⁸ P[hsp70-FLP122]; FRTG13, P[Ubi-GFPnls]2R2* with male *FRTG13, dRYBP¹/CyO* and by crossing female *yw¹¹¹⁸ P[hsp70-FLP122] f^{36a}; FRT42D sha¹ [forked⁺]/CyO* with male *w¹¹¹⁸; FRT42D dRYBP¹/CyO*. The larval progenies of the different crosses were subjected to a 1-hr, 37° heat pulse at 24–48 hr or 48–72 hr or 72–96 hr after egg deposition. For overexpression experiments the GAL4/UAS system was used (BRAND *et al.* 1994) at 25° and 29° with the lines *engrailed-GAL4 (en-GAL4)* (BRAND and PERRIMON 1993), *cubitus-GAL4 (ci-GAL4)*, *armadillo-GAL4 (arm-GAL4)* (SANSON *et al.* 1996), *Ultra-bithorax-GAL4 (Ubx-GAL4)* (CALLEJA *et al.* 1996), *scalloped-GAL4 (sd-GAL4)* (CALLEJA *et al.* 1996), *daughterless-GAL4 (da-GAL4)* (WODARZ *et al.* 1995), and *tubulin-GAL4 (tub-GAL4)*. To analyze the ovaries of the females, the virgins were crossed with males

and, after 3 days, the ovaries were dissected and stained with DAPI.

The lethal phase of the homozygous *dRYBP^l* was determined using a *dRYBP^l/CyOGFP* stock. Male and female *dRYBP^l/CyOGFP* were crossed and eggs (0–6 hr old) were collected, counted (~400 each experiment), and allowed to develop on plates [controls, using the *Df(1)^{w^{67c23}}* flies, were done in parallel]. The “non-GFP” embryos were counted and their survival was monitored throughout development.

The fertility of the homozygous *dRYBP^l* females was determined by making crosses of a single homozygous *dRYBP^l* female with two *Df(1)^{w^{67c23}}* males [controls were performed by crossing a single *Df(1)^{w^{67c23}}* female with two *Df(1)^{w^{67c23}}* males]. Similarly, the fertility of the homozygous *dRYBP^l* males was determined by making crosses of a single homozygous *dRYBP^l* male with two *Df(1)^{w^{67c23}}* virgins [controls were made with a single *Df(1)^{w^{67c23}}* male crossed to two *Df(1)^{w^{67c23}}* females].

To study the effect of the *dRYBP* mutations on the syncytial nuclear divisions, we made a recombinant stock *dRYBP^l, P[Histone-3:GFP]/CyO*. We have previously confirmed that *P[Histone-3:GFP]/P[Histone-3:GFP]* embryos do not show an aberrant nuclear division pattern. Female and male *dRYBP^l, P[Histone-3:GFP]/CyO* were crossed, embryos (0–3 hr old) were collected and fixed, and the pattern of nuclear divisions was observed. The syncytial mitotic phenotypes were variable in expressivity and penetrance. Also, the percentage of embryos showing mitotic phenotype was highly variable between experiments, making quantification very difficult. In this cross, the *dRYBP^l, P[Histone-3:GFP]* homozygous embryos were indistinguishable from the heterozygous embryos. Therefore to be sure that the mitotic phenotype was strictly maternal, we studied the pattern of nuclear divisions in embryos from female *dRYBP^l, P[Histone-3:GFP]/CyO* crossed with *Df(1)^{w^{67c23}}* males. The syncytial mitotic phenotypes observed in the embryos from this cross were also variable in expressivity and penetrance. Finally, the potential influence of the balancer chromosome on the syncytial mitotic phenotype was excluded by studying the pattern of DAPI staining in the 3-hr-old embryos from females and males *P[Histone-3:GFP]/CyO*. For this, embryos were collected, fixed, and incubated with DAPI (5 μ M in PBS) for 20 min; washed three times in PBS; and mounted for microscopic inspection. The pattern of nuclear divisions in these embryos was normal.

Studies of the lethality and of the cuticle embryonic phenotypes resulting from inactivation of *dRYBP* were performed using RNA interference. Males and females from the stocks *en-GAL4<UAS-dRYBP^{RNAi}* or *ci-GAL4<UAS dRYBP^{RNAi}* were allowed to lay eggs for 6 hr, and eggs were counted (~400 in each experiment) and allowed to develop on plates. Embryos were collected and mounted for microscopy analysis of the cuticle phenotypes, using standard methods.

Transgenic flies were obtained by standard procedures using *Df(1)^{w^{67c23}}* (*y⁻, w⁻*) as host flies. The mounting of larvae and adult flies was performed using standard protocols. Wing size was measured by mounting the wings and next analyzing mounted wings, using the ImageJ image analysis software. With this software, the length of the margin of each mounted wing is determined and used to calculate the wing area. The mean area of multiple mounted wings was used for comparisons.

Pelement mutagenesis and screening: The stock *y^lw¹¹¹⁸, P[*SUPor-P*]CG12190 [KG08683]/CyO* (BELLEN *et al.* 2004) that contains the markers *white⁺* and *yellow⁺* was used. Before starting the mutagenesis experiments, the stock was systematically outcrossed to clean possible second-site mutations. *y^lw¹¹¹⁸, P [y⁺w⁺ KG08683]/CyO* were crossed with female *w¹¹¹⁸, Sp/CyO; Δ 2-3 Dr/TM6Ubx*. Male progeny *w¹¹¹⁸, P [y⁺w⁺ KG08683]/CyO; Δ 2-3 Dr/+* was individually crossed with female *y^lw¹¹¹⁸, Sco/CyOwglacZ* and the *white⁻* progeny were scored to establish a

stock. Genomic DNA was isolated and PCR was performed using the primers 5'-AACACTGGCTGCGGTACTATCG-3', 5'-GCGGGAGAGAAGACAACGACTCC-3', and 5'-GTTCCACTAGCAGCGCCCATCCC-3'. PCR fragments were sequenced after analysis of fragment length. The precise excisions were checked for the lethality phenotype.

Immunohistochemistry: The antibody staining of embryos and imaginal discs was performed using standard protocols. The primary antibodies used were rabbit anti-DRYBP (1:100) (BEJARANO *et al.* 2005), mouse anti-Ubx (1:10) (WHITE and WILCOX 1984), mouse anti-Abd-B (1:20) (CELNIKER *et al.* 1990), rabbit anti-Abd-A (1:20) (MACIAS *et al.* 1990), rat anti-Antp (1:1500) (REUTER and SCOTT 1990), rabbit anti-Scr (1:100) (GLICKSMAN and BROWER 1988), mouse anti-en (1:200) (PATEL *et al.* 1989), rat anti-ci (1:50) (MOTZNY and HOLMGREN 1995), rabbit anti-Pc (WANG *et al.* 2004), rabbit anti-Pho (1:10) (BROWN *et al.* 1998), rabbit anti-Sce (1:200) (GORFINKIEL *et al.* 2004), mouse anti-cyclin A (Hibridoma Bank) (KNOBLICH and LEHNER 1993), rabbit anti-GFP (1:300) (Invitrogen, San Diego), rabbit anti-activated caspase 3 (Cell Signaling Technologies), anti-BrdU (1:10) (Roche, Indianapolis), rabbit anti- β -gal (Cappel), mouse anti- β -gal (Promega, Madison, WI), rat anti- α -tubulin (1:500) (Seralab), mouse anti-Histone-H3 trimethyl Lys 27 (1:500) (Active Motif), and mouse anti-Psc (1:50) (Hybridoma Bank). To-Pro (KIERNAN J 2001) and DAPI (KIERNAN J 2001) were used to stain the DNA. Daunomycin (CHAIRES 1983) was used to label the nucleoli. Apoptosis was analyzed by Tunnel (*In Situ* Cell Death Detection kit TMR, Roche), acridine orange (ABRAMS *et al.* 1993), and anti-activated caspase 3 antibody stainings.

Expression constructs: The *dRYBP- Δ Ct* and *dRYBP- Δ ZF* fragments were generated by PCR amplification from the *dRYBP*cDNA (LD18758, Drosophila FlyBase). For *dRYBP- Δ Ct*, the primers 5'-CATGTGCGACGTGCGGAAAGGAGGGATA CAAGGCCTC-3' and 5'-GAGGCCTTGTATCCCTCCTTTCC GCACGTGCGACATG-3' were used; for *dRYBP- Δ ZF* the 5'-CCTCCTCTCCTCCTGATTATGCCCAACGGGAAGTCC-3' and 5'-GGACTTCCCGTTGGGCATAATACAGGAGGAG GAGG-3' were used. The PCR fragments were cloned in pGEM and sequenced. The expression construct fragments were cloned in the pUAST vector and transgenic flies *P[UAS-dRYBP- Δ Ct]* and *P[UAS-dRYBP- Δ ZF]* were generated. The pUAST-*dRYBP^{RNAi}* construct was made with a PCR-amplified 480-bp fragment obtained using 5'-CCCGGTACCGGGC TTAAACGTGG-3' and 5'-CCCGGATCCAGGAACCTCCAC GC-3'. The PCR product was cloned in pGEM-easy (Promega), generating pGEM-*dRYBP-480^{RNAi}*, which, after several cloning steps (details upon request) using the vector pHBS (NAGEL *et al.* 2002) and the vector pUAST, yielded pUAST-*dRYBP^{RNAi}*. This construct was injected to generate the *P[UAS-dRYBP^{RNAi}]* transgenic flies.

Quantitative PCR: RNA from first instar larvae and adult flies of the *Df(1)^{w^{67c23}}, dRYBP^l/dRYBP^l, dRYBP ^{Δ 16}/dRYBP ^{Δ 16}, and *Df(2R) 58B3-59/CyOGFP* genotypes was isolated by lysis and homogenization in TriZOL (Invitrogen), using a Pellet Motor (short pulses during 30 sec), followed by centrifugation (3 min, 13,000 rpm), chloroform/isopropanol extraction, ethanol precipitation, and resuspension in DEPC-water. Both the RT and the PCR reactions were done following the instructions accompanying the TaqMan predesigned gene-expression assay kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) for Drosophila CG12190 (reference no.137861.2). RP49RNA (FOLEY *et al.* 1993) and 18srRNA primers and probes were used as controls.*

Co-immunoprecipitation, pull-down assays: *arm-GAL4>UAS-dRYBP* embryos were pelleted and lysed in 250 μ l of lysis buffer containing 1% Triton X-100, 10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA pH 8, and protease inhibitors

(Complete Mini, Roche) at 4° for 15 min. After removing the cellular debris by centrifugation, 400 µg total protein lysate were incubated overnight with 25 µl 10 mg/ml BSA and 4 µg anti-SCE antibody or 6 µg of anti-β-gal antibody as a negative control. This mixture was then incubated with 30 µl of Protein-A Sepharose beads (Sigma-Aldrich) in PBS for 2 hr while rotating at 4°. The beads were collected and washed with lysis buffer four times at 4°. Proteins were eluted from the beads by heating with 20 µl of 2× PAGE loading buffer [200 mM DTT, 4% SDS, 100 mM Tris (pH 6.8), 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue] at 100° for 5 min. The eluted fractions were resolved on a 15% PAGE gel system and transferred to a nitrocellulose membrane. After blocking, the membrane was incubated with anti-dRYBP antibody (1:500) followed by the appropriate secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP). Signals were detected with ECL reagents (Amersham, Arlington Heights, IL). We also attempted immunoprecipitation (IP) experiments with anti-PHO antibody. However, these experiments were not successful and, as a result, we performed pull-down assays to study the interaction with PHO.

Pull-down experiments used crude *Drosophila* extracts prepared by homogenizing 0.2 ml of third instar larvae in 0.4 ml of lysis buffer [1% NP-40, 1 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail (Roche) in PBS]. The homogenates were centrifuged, and the aqueous supernatant was mixed with the full-length His-dRYBP protein [extracted under native conditions and purified by following the QIA express (QIAGEN, Valencia, CA) protocols]. The complexes were purified using Ni-NTA Agarose (QIAGEN) and washed five times in 0.5 M NaCl in PBS and one time in 50 mM Tris (pH 6.8). Proteins were eluted by boiling in loading buffer and resolved by 15% SDS-PAGE. After blotting to nitrocellulose, the membrane was incubated with anti-PHO antibody (1:500) and the signal was detected using the Amersham ECL Western blotting analysis system.

5'-RACE analysis: Total RNA was extracted from *Df(1)^{w67c23}* (control) and from *dRYBP^{Δ55}/dRYBP^{Δ55}* embryos as described above for quantitative PCR. cDNAs containing the 5' transcript ends were identified using the 5'-RLM-RACE reagents (FirstChoice RLM-RACE kit; Ambion, Austin, TX), using the 5' primer adaptor provided and the primer 5'-TTCCCGTTGGGCATGTTGACACTGGC-3' based on the *dRYBP* sequence. The products were analyzed by agarose gel, isolated from the gel, cloned in pBluescript, and sequenced.

RESULTS

The *dRYBP* gene and dRYBP protein expression: The *dRYBP* gene (CG12190, FlyBase) is cytogenetically located at 58F7 and extends over 2.4 kb of genomic DNA (Figure 1A). 5'-RACE analysis shows that the transcription unit produces a single mRNA (Figure 1C). This transcript encodes a 150-aa protein (18 kDa) with a conserved amino terminus that includes an Npl4 zinc finger (NZF) type zinc finger (MEYER *et al.* 2000, 2002) (Figure 1B). The carboxy terminus is conserved within the dRYBP proteins, but shows no similarity with any domains in the databases (BEJARANO *et al.* 2005). Recently, a subgroup of the NZF domains (WANG *et al.* 2003; ALAM *et al.* 2004) that include RYBP (ARRIGONI *et al.* 2006) has been shown to possess ubiquitin-binding activity.

We have shown previously that the dRYBP protein is found in the oocyte nucleus, suggesting a maternal component of the protein (BEJARANO *et al.* 2005). Moreover, its nuclear expression is observed ubiquitously and throughout development. A closer inspection of dRYBP distribution within the nucleus (Figure 2, A–H) reveals that it does not colocalize to either the heterochromatin (labeled with DAPI, Figure 2D) or the nucleoli (labeled with Daunomycine, Figure 2H). However, like the PcG proteins (BUCHENAU *et al.* 1998; SAURIN *et al.* 1998; NETTER *et al.* 2001; FICZ *et al.* 2005; GRIMAUD *et al.* 2006a), dRYBP is distributed in the nucleus in a discrete punctate pattern (Figure 2, A and E). We refer to these sites of protein localization as dRYBP nuclear bodies. Typically, there are of the order of ~30 small discrete spots plus one more prominent spot per nucleus (Figure 2A). The dRYBP nuclear bodies are similar to both PC nuclear bodies (BUCHENAU *et al.* 1998; FICZ *et al.* 2005; GRIMAUD *et al.* 2006a), which appear as small discrete spots, and Posterior sex combs nuclear bodies (BUCHENAU *et al.* 1998), which appear as a combination of small spots plus one prominent spot. We have studied whether dRYBP nuclear distribution colocalizes with PC [using the transgenic flies PC-EFGP (DIETZEL *et al.* 1999)]. Additionally, we have studied whether dRYBP nuclear distribution colocalizes with the nuclear distribution of Histone H3 trimethyl Lys27 (H3K27me3) because it has been shown that H3K27me3 marks the PC nuclear bodies (T. CHEUTIN, personal communication). The results shown in Figure 2 indicate that some, but not all, of the dRYBP nuclear bodies colocalize with the PC bodies (Figure 2, A–C) and with the H3K27me3 nuclear bodies (Figure 2, E–G). The pattern of dRYBP distribution during the mitotic progression in the syncytial cell cycles of *Drosophila* embryos has been also analyzed. The first 13 mitotic divisions are synchronous and very rapid due to very abbreviated G₁ and G₂ phases and the absence of cytokinesis (ORR-WEAVER 1994; TRAM *et al.* 2001). Figure 2 shows the dynamic dRYBP distribution pattern throughout mitosis. dRYBP is dissociated from chromatin in prophase, remains visibly dissociated in metaphase (Figure 2, I–L), becomes associated with chromatin in anaphase (Figure 2, M–P), and remains bound in telophase. A similar dynamic pattern of distribution has also been observed for the *Drosophila* PC, PH, and PSC proteins (BUCHENAU *et al.* 1998).

Genetic and molecular characterization of *dRYBP* mutations: The *P*-element *P*[KG08683] or *P*[SUPor-*P*]CG12190^{KG08683} (BELLEN *et al.* 2004) is inserted in the 5'-UTR of the *dRYBP* gene (Figure 1A). This insertion, as described below, creates a null mutation in the *dRYBP* gene and we have therefore named it *dRYBP^l*. We have obtained two imprecise excisions from *dRYBP^l*: *dRYBP^{Δ16}* and *dRYBP^{Δ55}* (Figure 1A).

dRYBP^l is classified as a null mutation because homozygous *dRYBP^l* embryos and homozygous *dRYBP^l*

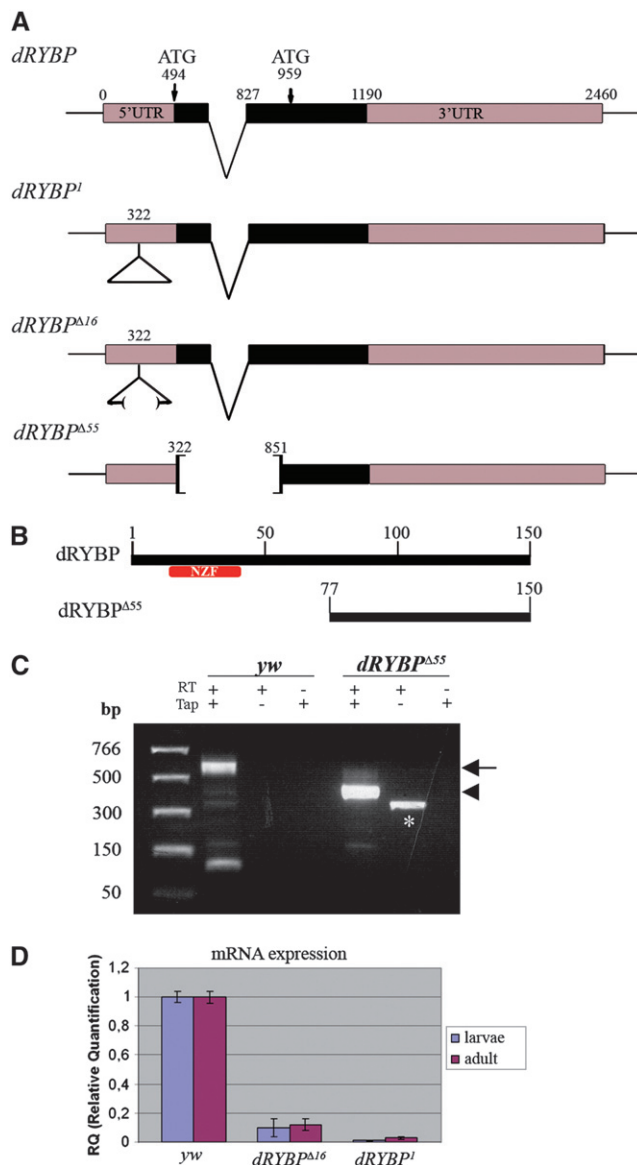


FIGURE 1.—Mutations in the *dRYBP* gene, 5'-RACE and quantitative PCR analysis. (A) The *dRYBP* gene structure, showing the positions of the two in-frame ATGs codons. *dRYBP*^I contains the *P[KG08683]*-element insertion (indicated as a triangle) at nucleotide position 322. *dRYBP*^{Δ16} is an incomplete deletion of the *P[KG08683]* element. *dRYBP*^{Δ55} deletes nucleotides 322–853. (B) The *dRYBP* protein contains an NZF domain (red) located in the amino terminus. The putative *dRYBP*^{Δ55} protein encoded by *dRYBP*^{Δ55} does not contain the NZF domain (red). (C) 5'-RACE analysis was performed using total RNA isolated from homozygous *Df(1)^{w67c23}* (*yw*) and homozygous *dRYBP*^{Δ55} embryos. The reverse-transcription (RT) reaction was performed in the presence and in the absence of Tobacco acid pyrophosphatase (Tap). A control containing “minus-Tap”-treated RNA was also performed. A band of 560 bp (arrow) was observed, corresponding to the *dRYBP* wt 5'-RACE product (lane *yw*, “plus-RT/plus-Tap”; the smaller band in this lane is an artifact). A band of 380 bp (arrowhead) corresponds to the *dRYBP*^{Δ55} 5'-RACE product (lane *dRYBP*^{Δ55}, plus-RT/plus-Tap). The band in the second lane of *dRYBP*^{Δ55} (marked with *) corresponds to “plus-RT/minus-Tap” is an artifact of the 5'-RACE protocol used (Instructions manual, FirstChoice-RLM-RACE; Ambion).

adult flies do not express *dRYBP* mRNA (Figure 1D). However, *dRYBP* protein is seen in *dRYBP*^I/*dRYBP*^I embryos. We interpret this to be a result of the maternal contribution (see MATERIALS AND METHODS), as no protein is seen in the imaginal discs of *dRYBP*^I/*dRYBP*^I larvae.

All the phenotypes observed in embryos, larvae, and adults of the *dRYBP*^I/*dRYBP*^I genotypes are highly variable both in their penetrance and in their expressivity, and similar results were obtained when the phenotypes were studied in *dRYBP*^I/*Df(2R) 58B3–59*. Flies *dRYBP*^I/*dRYBP*^I are sublethal and show progressive lethality throughout development. Only 13% of the *dRYBP*^I homozygous embryos reached the adult stage, with 43% dying during embryogenesis and 44% during larval/pupal development. Moreover, *dRYBP*^I/*dRYBP*^I larvae show a significant developmental delay: it takes 10 days at 25° for *dRYBP*^I/*dRYBP*^I first-instar larvae to reach the pupal stage, instead of the normal 4–5 days (ASHBURNER 1989). Nearly all (90%) homozygous *dRYBP*^I females are sterile and, in most cases, oogenesis is arrested at stage 8 (ASHBURNER 1989) (Figure 3J). Finally, *dRYBP*^I/*dRYBP*^I adult flies from the few *dRYBP*^I/*dRYBP*^I fertile mothers crossed with *dRYBP*^I/*dRYBP*^I fathers present the same phenotypes described below for the homozygous *dRYBP*^I offspring from *dRYBP*^I/+ parents.

The homozygous embryos from *dRYBP*^I/+ parents that reach the stage of larval cuticle formation (~40%) show no detectable morphological cuticle defects. However, some embryos from *dRYBP*^I/+ parents (see MATERIALS AND METHODS) that die before cuticle formation (~60%) show severe defects in their pattern of nuclear division (Figure 3, compare A–D with E–H) and during mitotic progression. The nuclear divisions are asynchronous and large irregularly formed nuclei are often observed, most likely representing nuclei that did not divide (Figure 3, E–H).

Neither *dRYBP*^I/+ nor *dRYBP*^I/*dRYBP*^I flies show phenotypic similarities to flies with mutations in the *PcG*/*trxG* genes (SATO and DENELL 1985, 1987; BUSTURIA and MORATA 1988; BREEN and HARTE 1991). However, *dRYBP*^I/*dRYBP*^I flies do show other very weak and low-penetrance morphological defects, including the presence of a distal gap in vein L5 (21% of the flies, Figure 4B), malformed legs (11% of the flies, most frequently the mesothoracic leg), umbrella-shaped wings (54% of the flies), and two to three bristles on the sixth sternite in the males (5% of the flies). Finally, the size of the wings of the *dRYBP*^I/*dRYBP*^I flies is reduced 27% when compared with wild type (Figure 4E).

(D) Quantitative PCR results showing the relative mRNA expression levels from homozygous *Df(1)^{w67c23}* (*yw*), *dRYBP*^I, and *dRYBP*^{Δ16} early first-instar larvae and adults.

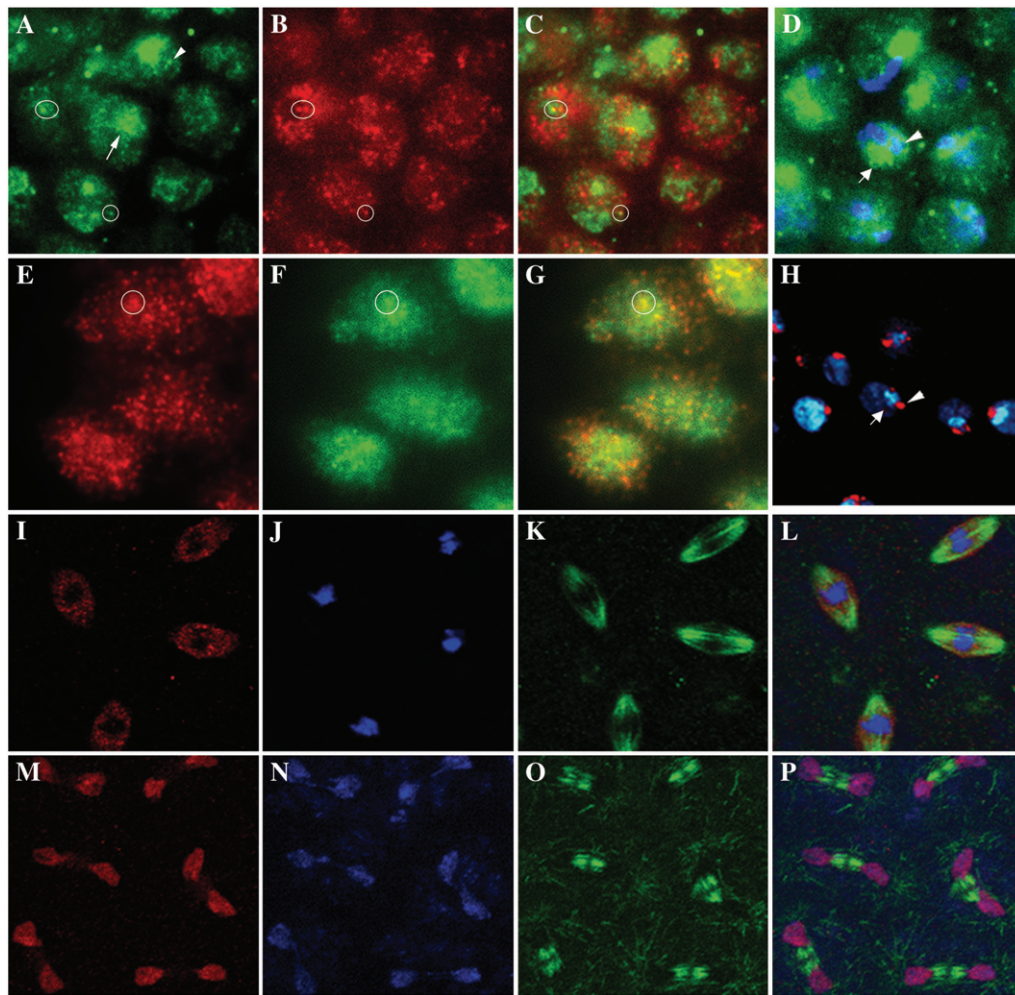


FIGURE 2.—Nuclear localization pattern of dRYBP protein. (A) dRYBP protein localization (green) in the embryonic nuclei. dRYBP nuclear bodies appear as both large (arrows) and small (arrowheads) structures. (B) H3K27me3 (red) colocalizes (circle) with dRYBP in some of the nuclear bodies (circle). (C) Merged image of A and B. The circles indicate colocalization in some of the bodies. (D) Staining of DAPI (blue) and dRYBP (green). (E) Embryonic nuclear distribution of dRYBP (red). (F) GFP nuclear localization of PC-EGFP transgenic embryos (circle indicates colocalization). (G) Merged image of E and F. (H) Daunomycin staining [used to label the nucleoli (red, arrowhead)] and dRYBP protein expression (blue, arrow) do not colocalize in the nuclei of the wing imaginal disc cells. (I–L) Localization of dRYBP protein (I, red), To-PRO (J, blue), and α -tubulin (K, green) during metaphase of syncytial embryonic nuclear divisions. dRYBP does not localize with To-PRO (J). (L) Merged image of I–

K. (M–P) Localization of dRYBP protein (M, red), To-PRO (N, blue), and α -tubulin (O, green) during anaphase of syncytial embryonic nuclear divisions. dRYBP (red) colocalizes with To-PRO (blue). (P) Merged image of M–O.

Even though we see no homeotic-like phenotypes in *dRYBP* mutant flies, given that the gene has been proposed to belong to the PcG, we have studied the expression of the homeotic proteins Ultrabithorax (UBX) (WHITE and WILCOX 1984), Abdominal-A (ABD-A) (MACIAS *et al.* 1990), and Abdominal-B (ABD-B) (CELNIKER *et al.* 1990; DE LORENZI and BIENZ 1990) in homozygous *dRYBP^l* embryos and larval imaginal discs. Expression of all these proteins was indistinguishable from wild type (data not shown).

The *dRYBP^{Δ16}* mutation is an imprecise excision of the original *dRYBP^l* that deletes 9 kb of the *P[KG08683]* element, but leaves the coding sequence of the *dRYBP* gene intact. *dRYBP* mRNA levels in *dRYBP^{Δ16}/dRYBP^{Δ16}* embryos and adults are severely reduced (Figure 1D), indicating that *dRYBP^{Δ16}* is a strong hypomorphic. The phenotypes of homozygous *dRYBP^{Δ16}* adult flies are highly variable in their penetrance and expressivity and extremely similar to the phenotype described above for *dRYBP^l*.

dRYBP^{Δ55} is a complete deletion of the *P[KG08683]* element that also removes 508 bp of the *dRYBP* gene

(nucleotides 323–831; Figure 1A), including sequences of the 5'-UTR as well as the amino-terminal sequences encoding the NZF of the dRYBP protein. *dRYBP^{Δ55}/dRYBP^{Δ55}* flies die progressively throughout development, are developmentally delayed, and, very infrequently, show the distal gap in the L5 vein, the umbrella-shaped wing, or the malformed mesothoracic leg phenotypes observed in the *dRYBP^l/dRYBP^l* flies. However, *dRYBP^{Δ55}/dRYBP^{Δ55}* females are not sterile and the *dRYBP^{Δ55}* homozygotes can be maintained as a stock. 5'-RACE analysis indicates that a shortened *dRYBP* mRNA is produced in *dRYBP^{Δ55}/dRYBP^{Δ55}* embryos (Figure 1C). This suggests that a truncated version of the dRYBP protein, most probably using the second in-frame ATG (Figure 1A), is produced in these flies. Finally, the expression levels and the cellular localization pattern of the truncated dRYBP protein in *dRYBP^{Δ55}/dRYBP^{Δ55}* embryos and imaginal discs are very similar to those of the full-length proteins in wild-type (wt) tissues (Figure 2).

The analysis of *dRYBP* mutant phenotypes indicates that the gene is required for progression through

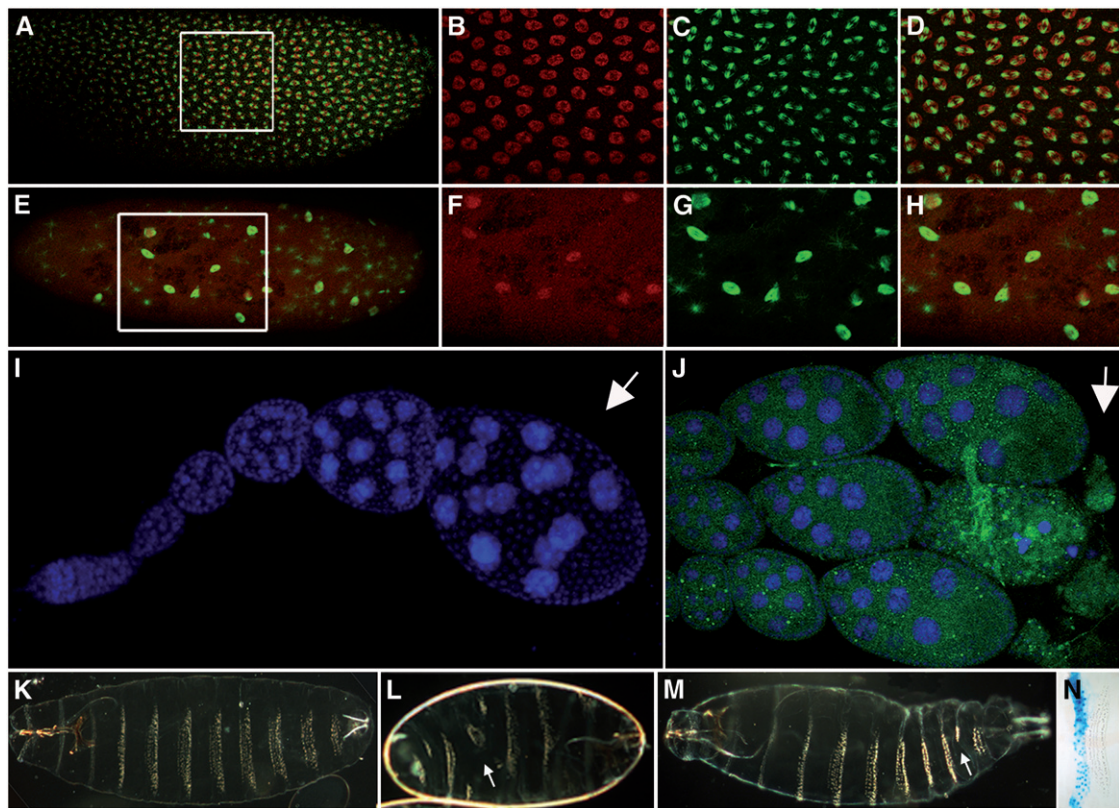


FIGURE 3.—*dRYBP* mutant phenotypes in the embryo. (A) Wild-type syncytial embryo stained with anti-*dRYBP* (red) and anti- α -tubulin (green) antibodies. There is a uniform distribution of nuclei along the embryo. (B–D) High magnification of the indicated area: *dRYBP* (B, red), α -tubulin (C, green), and merged (D). (E) Syncytial embryo from *dRYBP*^{+/+} parents showing a mitotic collapse and the distribution of *dRYBP* protein (red) and α -tubulin (green). There are few nuclei and these are evenly distributed along the embryo. (F–H) High magnification of the indicated area: *dRYBP* (F, red), α -tubulin (G, green), and merged (H). (I) Wild-type ovary stained with DAPI (blue) showing the stages of oogenesis (the arrow indicates stage 8 of oogenesis). (J) Ovary from a homozygous *dRYBP*^{Δ55} female (the arrow indicates the degenerated stage 8 of oogenesis). (K) Wild-type first-instar larval cuticle showing the pattern of denticle belts (anterior to the left). (L) Example of an *en-Gal4*>*UAS-dRYBP*_{RNAi} embryo showing a severely disrupted pattern of the denticle belts along the entire embryonic cuticle (arrow indicates region lacking denticles). (M) Example of an *en-Gal4*>*UAS-dRYBP*_{RNAi} embryo showing a weak effect on the pattern of the denticle belts along the embryonic cuticle (arrow indicates the effect on the seventh abdominal segment). (N) β -Gal expression (blue) in an *en-Gal4*>*UAS-lacZ* larva showing the domain of expression of the *en-Gal4* line in the posterior compartment.

mitosis during the nuclear divisions of the syncytial embryos, perhaps accounting in part for the developmental delay that is also observed in *dRYBP* mutant larvae. Moreover, *dRYBP*^{Δ55}/*dRYBP*^{Δ55} females are fertile, suggesting that the amino-terminal domain of the *dRYBP* protein is not required for its function in oogenesis.

Inactivation of *dRYBP* function by RNA interference: Phenotypes associated with the inactivation of the *dRYBP* function have been also studied by RNA interference (MONTGOMERY 2004), using *UAS-dRYBP*_{RNAi} constructs. The specificity of the inactivation was tested by examining the expression of *dRYBP* in *sd-GAL4*>*UAS-dRYBP*>*UAS-dRYBP*_{RNAi} imaginal discs. A strong reduction of *dRYBP* protein expression was observed (not shown). Moreover, the *sd-GAL4*>*UAS-dRYBP*>*UAS-dRYBP*_{RNAi} flies (not shown) showed rescue of the over-expression phenotypes seen in *sd-GAL4*>*UAS-dRYBP* (Figure 7D). The rescue might have resulted from a

dilution of the *sd-GAL4* driver cause by the presence of two *UAS*-containing constructs (*UAS-dRYBP* and *UAS-dRYBP*_{RNAi}) instead of one (*UAS-dRYBP*). To control for this dilution possibility, we studied the *dRYBP* protein expression in imaginal discs and adult phenotypes of *sd-GAL4*>*UAS-dRYBP*>*UAS-GFP* (not shown).

The *ci-GAL4* and the *en-GAL4* lines drive expression throughout development in the anterior and the posterior compartments, respectively, and have been used to inactivate *dRYBP* function. *en-Gal4*>*UAS-dRYBP*_{RNAi} flies exhibit progressive lethality throughout embryonic and larval development (~50% of the embryos die during embryogenesis). The larval cuticle phenotypes of the *en-Gal4*>*UAS-dRYBP*_{RNAi} embryos that survive to secrete cuticle show an aberrant pattern of segmentation with severe disruption in the pattern of the denticle belts, but no detectable homeotic transformations (Figure 3, L and M). The phenotype is highly variable both in penetrance and in expressivity.

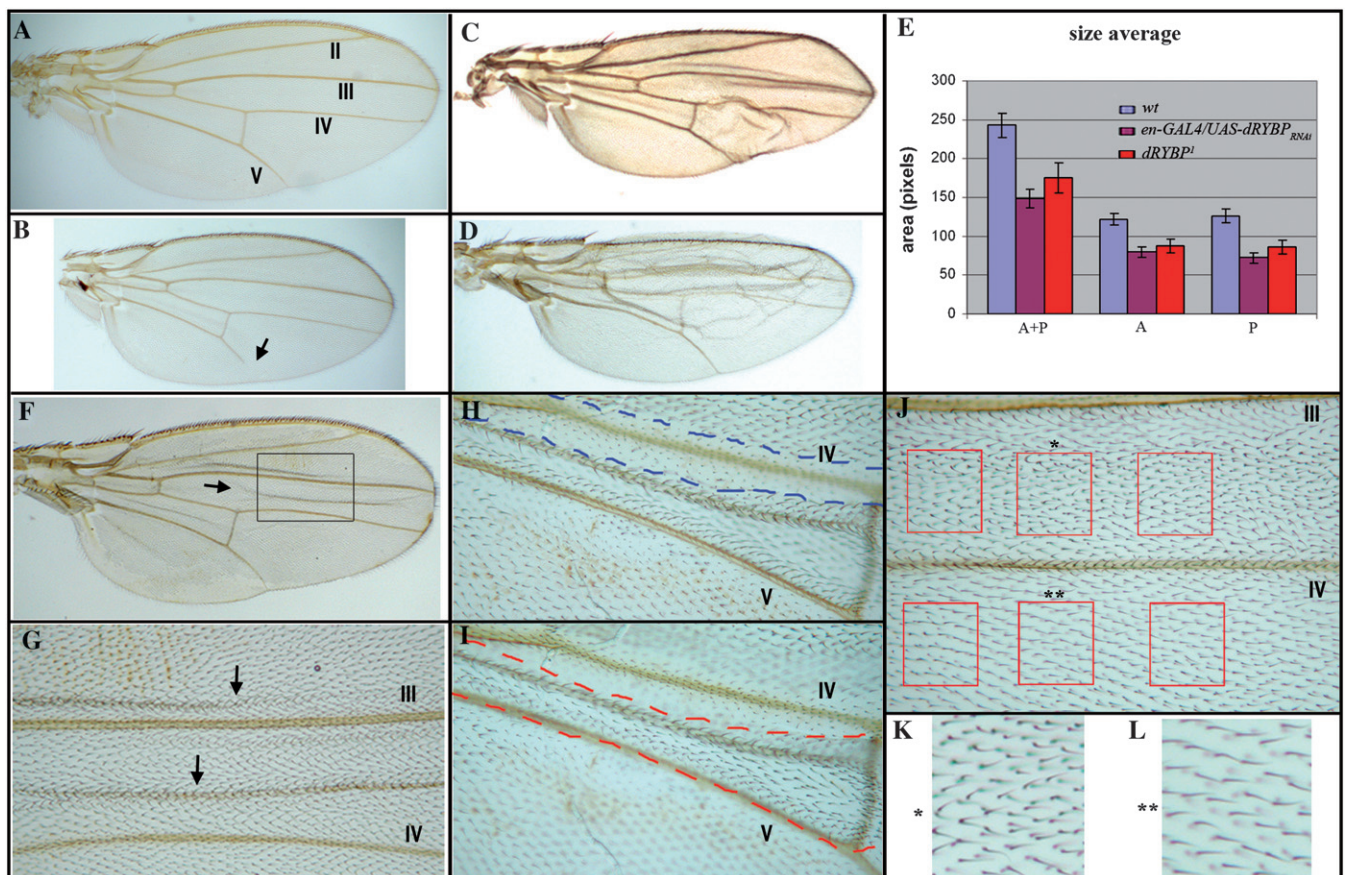


FIGURE 4.—*dRYBP* mutant phenotypes in the adult wings. (A) Wing from a wild-type male fly. The numbers of the veins are indicated. (B) Wing from a homozygous *dRYBP^l* male showing a reduction of the wing size and a distal gap in vein V (arrow). (C) Wing from an *en-Gal4>UAS-dRYBP^{RNAi}* male showing the blister in the posterior compartment and a reduction in wing size. (D) Wing from a *ci-Gal4>UAS-dRYBP^{RNAi}* male showing the blister in the anterior compartment and a reduction in wing size. (E) Area of wild-type male wings (blue), *en-Gal4>UAS-dRYBP^{RNAi}* male wings (purple), and homozygous *dRYBP^l* (red). “A+P” indicates entire wing area; “P” indicates area of the posterior compartment; “A” indicates area of the anterior compartment. (F) Wing containing somatic homozygous *dRYBP^l* mutant clones marked with *forked* and twin clones marked with *shavenoid*. The presence of mutant clones results in the formation of blisters (one of them is indicated with an arrow). (G) High magnification of the area indicated in F showing two blisters (arrows). (H) Ventral view of the wing containing *dRYBP^l* mutant clones marked with *forked* (dashed red line labels the *forked* clone) between veins IV and V, where the presence of the clone induces the appearance of a blister on the dorsal surface of the wing. (I) Dorsal view of the same wing (dashed blue line labels the *shavenoid* clone). (J) *dRYBP^l* mutant clone marked with *forked* between veins III and IV. The red squares identify an example of the areas chosen to calculate the trichome density in the mutant clones (*forked*) vs. the density of trichomes in the corresponding wild-type areas (red squares at bottom). (K) High magnification of the mutant *forked* area (marked with *). (L) High magnification of the wild-type area (marked with **). The density of trichomes is higher in K than in L.

Interestingly, the inactivation of *dRYBP* in the cells of the posterior compartments in the *en-Gal4>UAS-dRYBP^{RNAi}* embryos appears to have a nonautonomous effect in the adjacent cells of the anterior compartment: the pattern of both the anterior and the posterior compartments is disrupted (Figure 3L).

The wings of surviving *en-Gal4>UAS-dRYBP^{RNAi}* (Figure 4C) and of *ci-Gal4>UAS-dRYBP^{RNAi}* (Figure 4D) flies are blistered in the posterior and anterior compartments, respectively. Curiously, the overall size of the wings is reduced (Figure 4, compare A with C and D). Although the blistered-wings phenotype complicates the size quantifications, when wing size in the *en-Gal4>UAS-dRYBP^{RNAi}* flies is measured, an overall reduction of 40% is observed compared to the wild type

(Figure 4E), with a 43% reduction in the posterior compartment and a 35% reduction in the anterior compartment. This, once again, indicates a nonautonomous effect in the wild-type cells of the anterior compartment. The most likely explanation for this phenomenon is the “accommodation effect” first described by GARCIA-BELLIDO *et al.* (1994). Interestingly, the inactivation of the *dRYBP* function, by RNA interference, in the whole wing using the ubiquitous *arm-Gal4*, *da-Gal4*, and *tub-Gal4* drivers did not produce blistered wings (not shown), suggesting that the generation of the wing phenotypes observed in *en-Gal4>UAS-dRYBP^{RNAi}* and *ci-Gal4>UAS-dRYBP^{RNAi}* requires the contact of wild-type and mutant cells. Finally, the expression of the UBX protein in the wing and haltere imaginal

discs from *en-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi}* and *ci-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi}* larvae was normal (data not shown).

The disrupted-pattern phenotypes observed in embryos and the reduction of the wing size observed in the adults lacking *dRYBP* function prompted us to characterize the pattern of apoptosis in embryos and imaginal discs of the genotypes *dRYBP^l/dRYBP^l*, *en-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi}*, and *ci-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi}*. This was done by staining imaginal discs and embryos with acridine orange (ABRAMS *et al.* 1993) as well as analyzing the expression of both Tunnel and the activated form of caspase-3 (LEE and LUO 1999), each serving as markers of cell death. In all these assays, no differences in the pattern of apoptosis between *dRYBP* mutant and wild-type tissues were seen (data not shown).

The proliferation and aberrant mitosis phenotypes found in embryos from *dRYBP^l/+* parents, as well as the reduced wing size in *en-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi}* and *dRYBP^l/dRYBP^l*, could be caused by a disruption in cell-cycle progression. The Cdk1/cyclin A and Cdk1/cyclin B complexes control progression through mitosis (for a review see DESHPANDE *et al.* 2005). We therefore analyzed cyclin A (KNOBLICH and LEHNER 1993) expression in *en-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi}* wing imaginal discs. Cyclin A expression was identical in both the anterior and the posterior compartments of the wing disc (not shown).

Requirement of *dRYBP* throughout larval development: Somatic mutant clones of *dRYBP* were induced at different times during development, using the null allele *dRYBP^l* and the FLP/FRT system. We first induced homozygous *dRYBP^l* mutant clones in the wing disc, marked with GFP expression, to study the size of the mutant clones compared to the corresponding twin clones and to analyze the expression of the homeotic UBX and ABD-B proteins. The homozygous *dRYBP^l* mutant clones and the corresponding wild-type twin clones were of similar size (not shown) and no ectopic expression of either UBX or ABD-B proteins was seen (data not shown). To study the phenotype of the homozygous *dRYBP^l* mutant clones in the adult fly, we induced mutant clones marked with *forked* (*f*) (LINDSLEY and ZIMM 1992) and wild-type twin clones marked with *shavenoid* (*sha*) (LINDSLEY and ZIMM 1992). No homeotic transformations were found in the adult mutant clones. However, and independently of the time of clone induction, a number of observations were made: first, *forked* clones and *shavenoid* clones were of similar size, suggesting that the proliferation rates were not affected in the mutant clones; second, in ~30% of the clones studied, the presence of a *forked* clone on either one of the wing surfaces (ventral or dorsal) caused the appearance of a blister on the opposite surface (Figure 4, F–I). Finally, the *forked* mutant clones showed an increase in cell density. We calculated a 20% reduction in the number of wild-type trichomes compared to the *forked* clones (Figure 4, J–L). The phenotypes of these clones indicate that *dRYBP* is required for cellular

differentiation throughout larval development. The developmental requirement of *dRYBP* was also studied, using the *UAS-dRYBP^{-RNAi}* constructs to repress *dRYBP* expression in the imaginal discs. The blistered-wing phenotype (similar to that shown in Figure 4, C and D) was observed regardless of the time of clone induction (at 24–48, 48–72, and 72–96 hr after egg laying).

***dRYBP* genetic and molecular interactions:** The observed absence of homeotic phenotypes associated with lack of *dRYBP* function is not consistent with the proposed classification of *dRYBP* as a member of the *PcG* genes. Therefore, we studied whether *dRYBP* mutations genetically interact with mutations in the *PcG* and *trxG* genes. To this end, we used the *dRYBP^l*, *Pc³*, *Sce^l*, *pho^l*, *pho^{cv}*, *Trt^{R85}*, *trx^{E2}*, and *Rpd3^l* mutant alleles and scored for either enhancement or suppression of the *dRYBP*- and the *PcG*/*trxG*-associated phenotypes. Adult flies *dRYBP^l/dRYBP^l*; *Pc³/+*, *dRYBP^l/dRYBP^l*; *Trt^{R85}/+*, *dRYBP^l/dRYBP^l*; *Rpd3^l/+*, *dRYBP^l/dRYBP^l*; *pho^l/+*, and *dRYBP^l/dRYBP^l*; *pho^l/pho^{cv}* showed no enhancement or suppression of homeotic phenotypes. Furthermore, embryos and imaginal discs from *dRYBP^l/CyO*; *Pc³/+*, *dRYBP^l/CyO*; *Rpd3^l/+*, and *dRYBP^l/CyO*; *Trt^{R85}/+* showed no altered expression of the UBX or ABD-B proteins (data not shown).

In contrast, *dRYBP^l/dRYBP^l*; *Sce^l/+* males showed an increased number of sex combs in the meso- and metathoracic legs when compared with *Sce^l/+* males or with siblings *dRYBP^l/+*; *Sce^l/+*. Surprisingly, *dRYBP^l/dRYBP^l*; *Sce^l/+* males showed depigmentation of the fifth abdominal segment (Figure 5, B and E), a phenotype never seen in either *Sce^l/+* or *dRYBP^l/+*; *Sce^l/+* males. Additionally, *dRYBP^l/dRYBP^l*; *trx^{E2}/+* males (Figure 5D) showed an increased percentage of individuals exhibiting depigmentation of the fifth abdominal segment when compared with sibling *dRYBP^l/+*; *trx^{E2}/+* males or *trx^{E2}/+* males (Figure 5C). The expressivity of the depigmentation phenotype was strongly increased compared to the depigmentation of the abdomen of *trx^{E2}/+* males. No differences in ABD-B protein expression pattern were seen between *dRYBP^l/dRYBP^l*; *Sce^l/Sce^l* and *Sce^l/Sce^l* embryos. Likewise no differences in ABD-B protein expression pattern were observed between *dRYBP^l/dRYBP^l*; *trx^{E2}/trx^{E2}* and *trx^{E2}/trx^{E2}* embryos (not shown).

Possible molecular interactions between *dRYBP* and *SCE* and *PHO* were studied using immunoprecipitation and pull-down experiments. The *dRYBP* protein was found to interact with *SCE* and *PHO* proteins (Figure 5, F and G). The results of both the genetic and the molecular-interaction experiments indicate that the *dRYBP* protein interacts genetically with both *PcG* and the *trxG* proteins and molecularly with the *PcG* proteins *SCE* and *PHO*.

Function of the *dRYBP* protein domains in the generation of homeotic-like phenotypes: Overexpression of the *dRYBP* protein has been shown to generate homeotic-like phenotypes that can be modulated by

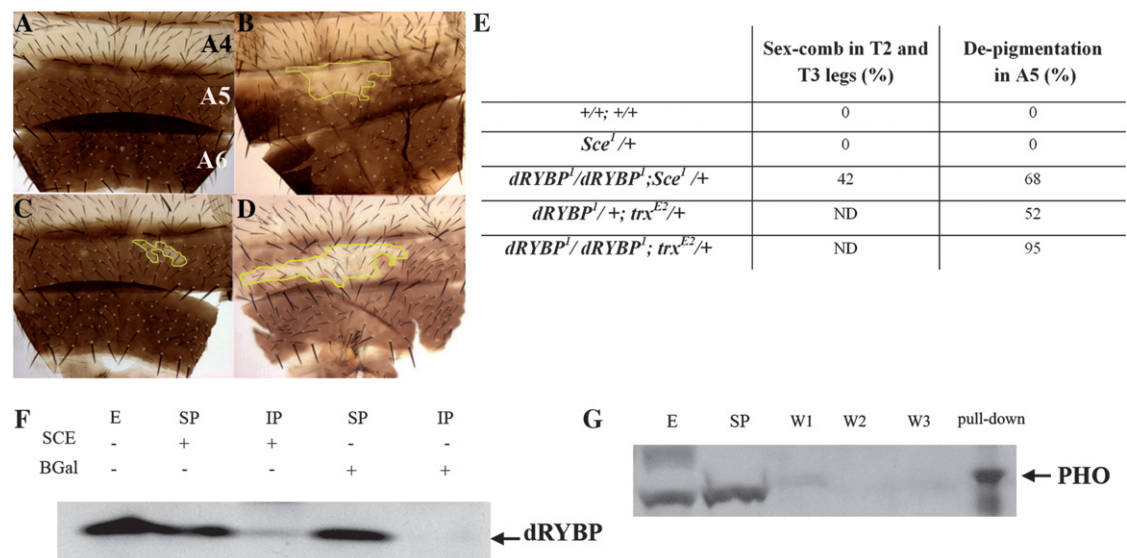


FIGURE 5.—*dRYBP* genetic and molecular interactions. (A) Dorsal abdomen of a wild-type adult male showing the A4, A5, and A6 segments. The A5 and A6 segments are pigmented. (B) Dorsal abdomen of a *dRYBP*¹/*dRYBP*¹; *Sce*¹/+ male showing patches of depigmentation of the A5 segment. (C) Dorsal abdomen of a *trx*^{E2}/+ male showing patches of depigmentation of the A5 segment. (D) Dorsal abdomen of an *dRYBP*¹/*dRYBP*¹; *trx*^{E2}/+ male showing patches of depigmentation. (E) Percentage of flies showing the extra sex comb phenotype in T2 and T3 legs and the depigmentation phenotype in the A5 segment of the males. ND: not determined. (F) *dRYBP* protein co-immunoprecipitates with SCE but not with BGAL used as a control. Shown is a Western blot of the IP with SCE antibody and BGAL antibody revealed with anti-*dRYBP* antibody. E, extract; SP, supernatant; IP, immunoprecipitation. (G) *dRYBP* protein pulls down the PHO protein. Shown is a Western blot of the *dRYBP* pull down revealed with anti-PHO antibody. E, extract; SP, supernatant; W, washes.

mutations in the PcG/*trxG* genes (BEJARANO *et al.* 2005). Interestingly, and depending on the cellular context, high levels of *dRYBP* caused either the ectopic expression or the repression of the homeotic UBX protein (BEJARANO *et al.* 2005 and Figure 7, C and I). To further investigate the role *dRYBP* plays in the regulation of homeotic genes, we analyzed the effects of overexpression of *dRYBP* in different cellular contexts and studied the function of the domains of the *dRYBP* protein in the generation of the homeotic-like phenotypes. We used the *arm-GAL4* line, which drives the expression ubiquitously and throughout development (SANSON *et al.* 1996), the *Ubx-GAL4* line, which drives the expression in the haltere and third leg imaginal disc (DE NAVAS *et al.* 2006), and the *sd-GAL4* line, which drives the expression in the wing and haltere imaginal discs.

Ubx-GAL4 > UAS-dRYBP flies exhibit ectopic sex combs on the metathoracic (third) legs (Figure 6, B–E). Sex comb identity is determined by the *Sex comb reduced* (*Scr*) gene (STRUHL 1982; PATTATUCCI and KAUFMAN 1991), and the homeotic Sex comb reduced (SCR) protein is expressed in the prothoracic (first) leg imaginal disc (Figure 6F), but not in the second (mesothoracic) or third leg discs. We looked at the expression of SCR (GLICKSMAN and BROWER 1988) in *Ubx-GAL4 > UAS-dRYBP* imaginal leg discs and found that it is ectopically expressed in the third imaginal leg discs (Figure 6, G–I). It is important to note that SCR expression only partially overlaps with the domain where *dRYBP* is overexpressed (Figure 6, G–I). The *arm-GAL4 > UAS-dRYBP* flies also

occasionally showed ectopic sex combs in the second and third legs (not shown). Moreover, *arm-GAL4 > UAS-dRYBP* males showed the Mischadestral pigmentation (Mcp) (LEWIS 1978) and the Ultra-abdominal (Uab) (LEWIS 1978) phenotypes. The Mcp phenotype consists of ectopic pigmentation in the fourth abdominal segment (Figure 6, K and M) and the Uab phenotype consists of the appearance, in the first abdominal segment, of long bristles morphologically characteristic of posterior abdominal segments (Figure 6, K and L). Although these phenotypes result from the misexpression of the homeotic proteins (LEWIS 1978; BUSTURIA *et al.* 1989; CELNIKER *et al.* 1990; MACIAS *et al.* 1990; SANCHEZ-HERRERO 1991), we could find no misregulation of ABD-A and ABD-B homeotic proteins in *arm-GAL4 > UAS-dRYBP* embryos.

A functional analysis of *dRYBP* protein domains was performed by expressing the *UAS-dRYBP-ΔZF* and *UAS-dRYBP-ΔCt* constructs. *dRYBP-ΔZF* deletes the protein's amino-terminal domain that contains the NZF sequences (amino acids 1–70, MATERIALS AND METHODS, Figure 7A); *dRYBP-ΔCt* deletes the protein's carboxy-terminal domain (amino acids 70–150).

sd-GAL4 > UAS-dRYBP-ΔCt flies showed no wing or haltere phenotypes. We looked at the expression of *dRYBP* protein in the wing imaginal discs and observed a weak and diffused expression (not shown), suggesting either that the *dRYBP-ΔCt* protein is not stable or that it is not fully recognized by the anti-*dRYBP* antibody.

sd-GAL4 > UAS-dRYBP-ΔZF flies exhibit transformation of wings toward haltere, as indicated by the appearance

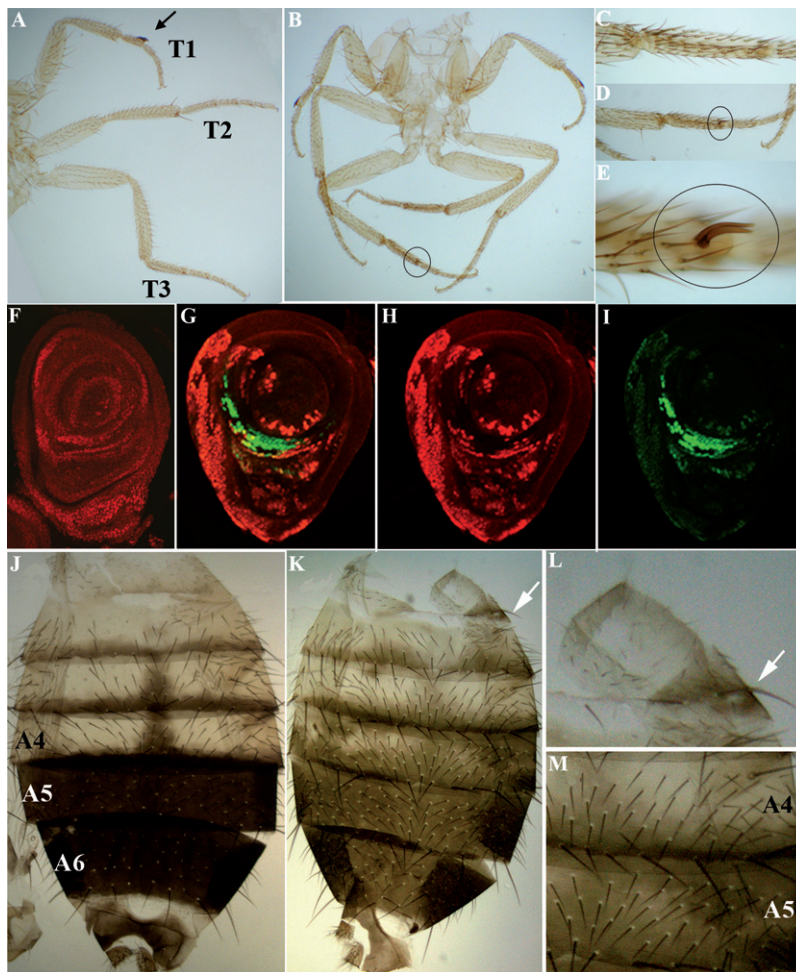


FIGURE 6.—Overexpression of *dRYBP* in the leg and abdomen. (A) Legs (T1, T2, and T3) of a wild-type male. The T1 leg shows the sex comb in the basitarsus (arrow). (B) Legs from an *Ubx-Gal4>UAS-dRYBP* male showing the appearance of an extra sex comb on the T3 leg (circle). (C) Basitarsus of a wild-type male T3 leg. (D–E) Higher magnification of the basitarsus shown in B (circles). (F) Expression of the SCR protein (red) in a wt male T1 leg imaginal disc. (G) Merged expression of *dRYBP* (red) and SCR (green) in the *Ubx-Gal4>UAS-dRYBP* T3 leg imaginal disc. The expression of SCR does not completely overlap with the expression of *dRYBP*. (H) Expression of *dRYBP* (red). (I) Expression of SCR (green). (J) Abdomen of a wild-type male showing the A4, A5, and A6 segments. A5 and A6 are pigmented. (K) Abdomen of an *arm-Gal4>UAS-dRYBP* male showing the Uab phenotype (long bristles in the A1 segment marked by an arrow) and the Mcp phenotype (ectopic pigmentation in the A4 segment). (L) Higher magnification of Uab phenotype shown in K. (M) Higher magnification of Mcp phenotype shown in K.

of haltere-like trichomes in the wing (Figure 7H). This transformation is likely mediated by the ectopic expression of UBX in the wing disc (Figure 7, C and F). The phenotype in the wings and the ectopic expression of UBX in the *sd-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* wing imaginal discs were very similar to those of *sd-Gal4>UAS-dRYBP* (Figure 7, D and G, and BEJARANO *et al.* 2005). Moreover, in both cases the ectopic expression of UBX did not completely overlap with the domain of *dRYBP* overexpression. Curiously, we observed that the *dRYBP* protein in the imaginal discs of *sd-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* larvae is, primarily, localized outside the nucleus, suggesting that this truncated protein might be functional outside the nucleus.

A haltere phenotype consisting of small-size haltere covered with wing-like trichomes was seen in both *sd-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* and *Ubx-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* flies (Figure 7, M and R). The haltere discs of both *sd-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* and *Ubx-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* (Figure 7, N–P) larvae showed repression of the UBX expression, as was seen with the overexpression of *UAS-dRYBP* (Figure 7, I–K).

These results indicate that the carboxy terminus is required while the amino terminus is dispensable for the repression of UBX in the haltere disc and for the

ectopic expression of UBX in the wing discs, both mediated by the overexpression of the *dRYBP* protein.

DISCUSSION

The *dRYBP* loss-of-function phenotypes are remarkable in the high variability of both their penetrance and their expressivity. Given the current knowledge of *dRYBP* function, it is difficult to explain the dramatic phenotypic variability. A striking illustration of this is that some embryos experience complete mitotic collapse (Figure 3, E–H) while others (Figure 4B) develop completely to adulthood. As there are no genes in the *Drosophila* genome that are clearly homologous to *dRYBP*, it is unlikely that this is due to the existence of homologous proteins that replace *dRYBP* function at a given developmental time.

It is possible that *dRYBP* phenotypic variability reflects on the robustness of the embryos, which is dependent on the fitness of the mother as well as the extrinsic and intrinsic environmental perturbations to which the flies are exposed (STELLING *et al.* 2004; FRIEDMAN and PERRIMON 2007). *dRYBP* function might remain “latent” in the cell until the requirement becomes essential in response, for example, to specific stress

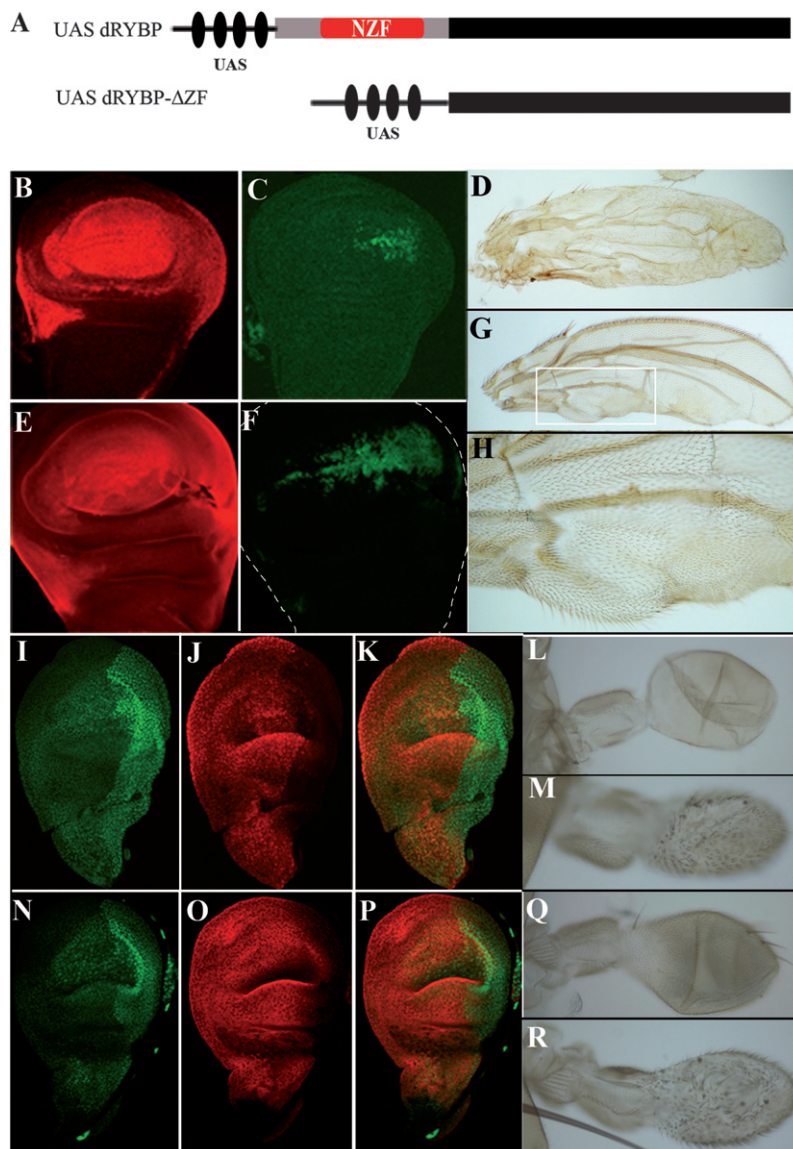


FIGURE 7.—Overexpression of dRYBP in the wing and haltere imaginal discs: function of the carboxy-terminal domain. (A) Scheme of the UAS-dRYBP and UAS-dRYBP-ΔZF (lacking the NFZ domain) constructs. (B) Expression of dRYBP (red) in a *sd-Gal4>UAS-dRYBP* wing imaginal disc. (C) Expression of UBX (green) in a *sd-Gal4>UAS-dRYBP* wing imaginal disc. (D) Wing of a *sd-Gal4>UAS-dRYBP* fly. (E) Expression of dRYBP (red) in a *sd-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* wing imaginal disc. (F) Expression of UBX (green) in a *sd-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* wing imaginal disc. (G) Wing of a *sd-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* fly showing the trichomes typical of the haltere. (H) Higher magnification of the indicated area in G to show the haltere-like trichomes. (I–K) Expression of UBX (I, green) and dRYBP (J, red) in an *Ubx-Gal4>UAS-dRYBP* haltere disc. (L) Wild-type haltere. (M) *Ubx-Gal4>UAS-dRYBP* haltere, showing the trichomes similar to the wing trichomes. (Q) *Ubx-Gal4* haltere. The *Ubx-Gal4* line is inserted in the *Ubx* gene and shows the haplo-insufficient *Ubx* phenotype consisting of the appearance of some hairs in the capitulum (compare with L). (N–P) Expression of UBX (N, green) and dRYBP (O, red) in an *Ubx-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* haltere disc (P, merged). (R) Haltere of an *Ubx-Gal4>UAS-dRYBP-ΔZF* fly.

conditions. Stress of this type could happen during the rapid nuclear divisions that take place in the syncytial embryo or when, in addition to the removal of the dRYBP protein, an intrinsic perturbation is introduced, *i.e.*, modifying the genetic background by introducing mutations in other genes. In both cases, depending on the robustness of the individual, cells lacking dRYBP function may respond either by terminating mitosis (Figure 3, E–H) or by affecting morphological development (Figure 5, A–E).

Another characteristic of dRYBP inactivation are the differences between the phenotypes caused by null mutations and those caused by RNA interference. For example, *dRYBP¹/dRYBP¹* embryos that reach the stage of cuticle formation do not show larval cuticle morphological defects. In contrast, *en-Gal4>UAS-dRYBP-RNAi* larvae show severe cuticle defects (Figure 3, L and M). Additionally, the wings of *dRYBP¹/dRYBP¹* flies do not show the blistered phenotype observed in *en-Gal4>UAS-*

dRYBP-RNAi or *ci-Gal4>UAS-dRYBP-RNAi* flies (Figure 4, C and D). A trivial explanation for these phenotypic differences is that the *UAS-dRYBP-RNAi* construct, in addition to inactivating the expression of dRYBP, is also inactivating the function of other genes. We have seen reduced dRYBP expression and rescue of the overexpression phenotypes in *sd-Gal4>UAS-dRYBP*, *UAS-dRYBP-RNAi* imaginal discs and adults, suggesting that dRYBP inactivation using *UAS-dRYBP-RNAi* is quite specific. A more attractive and plausible explanation is that the phenotypes caused by inactivation of dRYBP function are strongly revealed when wild-type cells are in physical contact with dRYBP mutant cells. This idea is supported by several observations. First, *dRYBP¹/dRYBP¹* mutant clones in the wing, where wild-type and dRYBP mutant cells are in contact, cause a blistered phenotype (Figure 4, F–L) similar to that seen in *en-Gal4>UAS-dRYBP-RNAi* and *ci-Gal4>UAS-dRYBP-RNAi* (Figure 4, C and D). Second, *dRYBP¹/dRYBP¹* larvae do not show

cuticle defects while *en-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi}* in which mutant cells physically contact wild-type cells, show strong and nonautonomous phenotypes (Figure 3, L and M). Third, wings of *da-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi} tub-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi}* and *arm-Gal4>UAS-dRYBP^{-RNAi}* flies, in which mutant cells are not in contact with wild-type cells because *da-Gal4*, *tub-Gal4*, and *arm-Gal4* inactivate dRYBP in all the wing cells, did not show the blistered phenotype. The study of the factors involved in the generation of these nonautonomous defects will facilitate the understanding of dRYBP function in the process of cellular differentiation.

dRYBP involvement in the mechanisms of PcG/trxG—expression of the protein, genetic analysis, and molecular interactions: dRYBP expression is restricted to the nonnucleoli portion of the nucleus and forms a pattern of discrete spots very similar to the so-called PcG nuclear bodies reported for the PC, PH, and PSC proteins. Like PSC, the dRYBP nuclear expression pattern consists of both large and small bodies, numbering ~30 per embryonic nucleus (BUCHENAU *et al.* 1998; SAURIN *et al.* 1998; DIETZEL *et al.* 1999; NETTER *et al.* 2001; FICZ *et al.* 2005; GRIMAUD *et al.* 2006a) (Figure 2A). The partial overlap of dRYBP and PC distribution in the nuclear bodies (Figure 2, C and G) suggests that dRYBP functions, together with PcG, in the regulation of a subset of PcG target genes. Moreover, it also indicates that dRYBP, independently of PcG, is involved in the regulation of other processes.

dRYBP (Figure 2, I–P) and PcG proteins show similar dynamic mitotic distribution patterns during the nuclear cycles in the syncytial embryo (ABRAMS *et al.* 1993; BUCHENAU *et al.* 1998; NETTER *et al.* 2001; MARTINEZ *et al.* 2006; O'DOR *et al.* 2006). This distribution pattern may indicate a role for the protein in the regulation of cell-cycle progression because *dRYBP* mutant syncytial embryos exhibit a severe disruption in the pattern of nuclear divisions (Figure 3, E–H). The involvement of PcG/trxG proteins in the regulation of cell-cycle progression has been proposed. For example, Polycomb response elements (PREs) have been identified in the cell-cycle regulator *cyclin A* gene (MARTINEZ *et al.* 2006) while mutations in *ph*, *Pc*, and *Psc*, all members of the PcG, show severe defects in chromosomal segregation (O'DOR *et al.* 2006). The dRYBP protein might very well participate with PcG/trxG in this process.

A role for *dRYBP* in mitotic progression and control of cell proliferation may explain the slow larval growth observed in *dRYBP^l/dRYBP^l* and the reduction of the wing size when *dRYBP* is inactivated (Figure 4, B–D). Furthermore, the described increase in cell density observed in *dRYBP* mutant clones (Figure 4, F–L) suggests that the gene might also have a role in cell differentiation.

The interactions described between loss-of-function *dRYBP* mutations and mutations in *Sce* (a PcG) and the *trx* (a trxG) genes show that *dRYBP* participates in the

maintenance of both the repressed transcriptional states controlled by the PcG genes and the active transcriptional states controlled by the trxG genes. The interaction with mutations of the *Sce* gene exhibits enhancement of the Pc-like phenotype (*i.e.*, increased number of sex combs) and enhancement of the trx-like phenotype (*i.e.*, increased depigmentation of the fifth abdominal segment). We have observed a molecular interaction between PHO and dRYBP proteins (Figure 5G). However, we did not find a genetic interaction between mutations in both genes, using the *dRYBP^l* and the *pho^l* and *pho^{cv}* mutant alleles. The *dRYBP^l/dRYBP^l; pho^l/+* flies do not show homeotic phenotypes and the *dRYBP^l/dRYBP^l; pho^l/pho^{cv}* flies do not show enhancement or suppression of the number of ectopic sex combs observed in *pho^l/pho^{cv}* flies. We believe that this is probably due to the strong maternal effect of the PHO protein (BREEN and DUNCAN 1986). We have shown that the dRYBP and SCE proteins physically interact. It has been shown that the murine RYBP protein is a novel ubiquitin-binding protein that is itself ubiquitinated (ARRIGONI *et al.* 2006). Furthermore, it has been shown that the RING1B, the mouse SCE homolog and a known ubiquitin E3 ligase, promotes RYBP ubiquitination (ARRIGONI *et al.* 2006). The observed interaction between *dRYBP* and *Sce* suggests that this may be the case in *Drosophila* as well. The interaction with mutations in the *trx* gene clearly shows that *dRYBP* is able to interact not only with PcG complexes, but also with trxG.

dRYBP involvement in the mechanisms of PcG/trxG—analysis of the overexpression phenotypes: High levels of the dRYBP protein generate homeotic-like phenotypes in the legs, wings, haltere, and abdomen of flies (Figures 6 and 7). The carboxy-terminal domain of the dRYBP protein is sufficient to cause misexpression of the homeotic proteins to generate the homeotic-like phenotypes (Figures 6 and 7). For example, the appearance of extra sex combs in the meta-thoracic legs results from the ectopic expression of the homeotic Sex comb-reduced protein (Figure 6), while the transformation of wing into haltere (Figure 7, D–H) results from the ectopic expression of the UBX protein (Figure 7C).

Curiously, overexpression of dRYBP in the wing and leg imaginal discs does not result in the ectopic expression of UBX and SCR throughout the entire overexpression domain (Figure 6). This suggests that there is a partial inactivation of the PcG proteins in these regions, which could be due to transcriptional repression of PcG genes or to sequestration of PcG proteins. We investigated whether PC expression is decreased in *en-GAL4>UAS-dRYBP* wing imaginal discs and found no difference between the anterior and the posterior compartments (not shown). This indicates that the homeotic-like phenotypes are probably due to sequestration of the PcG proteins mediated by dRYBP overexpression. This possibility is supported by the observed

modulation of the homeotic phenotypes by PcG and trxB mutations (BEJARANO *et al.* 2005). The proposed sequestration of the PcG/trxB protein complexes is mediated through the carboxy terminus of the protein, as the ectopic expression of the UBX protein in the wing disc results from the overexpression of both the full-length dRYBP and the dRYBP-ΔZF proteins (Figure 7).

The phenotypes associated with the overexpression of some PcG/trxB proteins have been reported (MARTIN and ADLER 1993; PETERSON *et al.* 2004). Psc and Su(z)2 have been overexpressed by heat treatment of the transgenic flies containing hs-Psc and hs-Su(z)2 and neither one shows mutant phenotypes in any tissue (MARTIN and ADLER 1993). Overexpression of the SPM domain of the Sex comb in midleg (SCM) protein produces homeotic-like phenotypes that can be modulated by PcG mutations (PETERSON *et al.* 2004). Perhaps genes of PcG/trxB involved in recruitment or aggregation of PcG/trxB proteins produce, when overexpressed, sequestration of PcG/trxB proteins and, therefore, homeotic-like phenotypes.

Within the haltere, where homeotic-like phenotypes are also produced by the carboxy-terminal domain of the dRYBP protein, the effect of high-level dRYBP expression on UBX expression is distinct: UBX expression is repressed throughout the entire domain of dRYBP overexpression. As a result, the adult haltere shows a phenotypic transformation toward wing but without taking on the size and shape of a wing (Figure 7, M and R). Recently, it has been shown that the size of the haltere is determined by the combined levels of decapentaplegic (DPP) and UBX (DE NAVAS *et al.* 2006). Perhaps high levels of dRYBP expression repress Dpp expression and this, together with the reduction of UBX expression, results in the small-haltere phenotype (Figure 7, M and R). Further characterization of this phenomenon may allow the separation of the mechanisms of size regulation and differentiation.

Here we have presented an examination of the phenotypes associated with inactivation of the dRYBP gene and an initial functional and biochemical characterization of the dRYBP protein. dRYBP was previously classified as a PcG gene on the basis of the protein molecular interactions and the phenotypes resulting from its overexpression (GARCIA *et al.* 1999; BEJARANO *et al.* 2005). However, the results from the present study indicate that dRYBP is a PcG- and trxB-interacting gene that participates in many biological processes, but it is not a "classical" PcG gene because dRYBP loss-of-function mutations do not show homeotic phenotypes. This demonstrates the danger of classification of a gene function based on overexpression phenotypes. Our results indicate that dRYBP is a PcG- and trxB-interacting gene that participates, together with PcG/trxB, in the mechanisms of cell-identity control. Furthermore, these results should provide the basis for a more complete description and understanding of the mechanisms in

which dRYBP is involved, including the control of the nuclear divisions in the syncytial embryo and the regulation of cell differentiation.

We are very grateful to Fernando Diaz Benjumea, Keith Harshman, and Ernesto Sánchez-Herrero for discussions and critically reading the manuscript. We especially thank Fernando Diaz Benjumea for his help with the somatic dRYBP mutant clones and Thierry Cheutin and people of the laboratory of Giacomo Cavalli for their help with the dRYBP/PC/H3K27m3 colocalization experiments; Miguel A. Vidal for discussions; Judy Kassis, Richard Jones, and Isabel Guerrero for the PHO, PC, and SCE antibodies, respectively; Terry Orr-Weaver, Renato Paro, and the Bloomington Stock Center for fly stocks; Rocio Simón for help with some of the experiments; and the Madrid Drosophila community for reagents and discussions. This work was supported by grants from Dirección General de Investigación Científica y Técnica (BMC-2002-00524 and BFU-2005-02319) and the Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña (FMM-2006) to A.B. and by an institutional grant to the Centro de Biología Molecular Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Autónoma de Madrid from Fundación Ramón Areces.

LITERATURE CITED

- ABRAMS, J. M., K. WHITE, L. I. FESSLER and H. STELLER, 1993 Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**: 29–43.
- ALAM, S. L., J. SUN, M. PAYNE, B. D. WELCH, B. K. BLAKE *et al.*, 2004 Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *EMBO J.* **23**: 1411–1421.
- ARRIGONI, R., S. L. ALAM, J. A. WAMSTAD, V. J. BARDWELL, W. I. SUNDQUIST *et al.*, 2006 The Polycomb-associated protein Rybp is a ubiquitin binding protein. *FEBS Lett.* **580**: 6233–6241.
- ASHBURNER, M., 1989 *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- BEJARANO, F., I. GONZÁLEZ, M. VIDAL and A. BUSTURIA, 2005 The *Drosophila* RYBP gene functions as a *Polycomb*-dependent transcriptional repressor. *Mech. Dev.* **122**: 1118–1129.
- BELLEN, H. J., R. W. LEVIS, G. LIAO, Y. HE, J. W. CARLSON *et al.*, 2004 The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**: 761–781.
- BRAND, A. H., and N. PERRIMON, 1993 Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401–415.
- BRAND, A. H., A. S. MANOUKIAN and N. PERRIMON, 1994 Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol.* **44**: 635–654.
- BREEN, T. R., and I. M. DUNCAN, 1986 Maternal expression of genes that regulate the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **118**: 442–456.
- BREEN, T. R., and P. J. HARTE, 1991 Molecular characterization of the trithorax gene, a positive regulator of homeotic gene expression in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **35**: 113–127.
- BROCK, H. W., and C. L. FISHER, 2005 Maintenance of gene expression patterns. *Dev. Dyn.* **232**: 633–655.
- BROWN, J. L., D. MUCCI, M. WHITELEY, M. L. DIRKSEN and J. A. KASSIS, 1998 The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol. Cell* **1**: 1057–1064.
- BUCHENAU, P., J. HODGSON, H. STRUTT and D. J. ARNDT-JOVIN, 1998 The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in *Drosophila* embryos: impact on models for silencing. *J. Cell Biol.* **141**: 469–481.
- BUSTURIA, A., and G. MORATA, 1988 Ectopic expression of homeotic genes caused by the elimination of the Polycomb gene in *Drosophila* imaginal epidermis. *Development* **104**: 713–720.
- BUSTURIA, A., J. CASANOVA, E. SANCHEZ-HERRERO, R. GONZÁLEZ and G. MORATA, 1989 Genetic structure of the abd-A gene of *Drosophila*. *Development* **107**: 575–583.
- CALLEJA, M., E. MORENO, S. PELAZ and G. MORATA, 1996 Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**: 252–255.

- CAO, R., L. WANG, H. WANG, L. XIA, H. ERDJUMENT-BROMAGE *et al.*, 2002 Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**: 1039–1043.
- CAO, R., Y. TSUKADA and Y. ZHANG, 2005 Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol. Cell* **20**: 845–854.
- CELNIKER, S. E., S. SHARMA, D. J. KEELAN and E. B. LEWIS, 1990 The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: cis-regulation in the Abdominal-B domain. *EMBO J.* **9**: 4277–4286.
- CHAIRES, J. B., 1983 Daunomycin inhibits the B leads to Z transition in poly d(G-C). *Nucleic Acids Res.* **11**: 8485–8494.
- CZERMIN, B., R. MELFI, D. MCCABE, V. SEITZ, A. IMHOF *et al.*, 2002 *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**: 185–196.
- DE LORENZI, M., and M. BIENZ, 1990 Expression of Abdominal-B homeoproteins in *Drosophila* embryos. *Development* **108**: 323–329.
- DE NAPOLES, M., J. E. MERMOUND, R. WAKAO, Y. A. TANG, M. ENDOH *et al.*, 2004 Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell* **7**: 663–676.
- DE NAVAS, L. F., D. L. GARAULET and E. SANCHEZ-HERRERO, 2006 The ultrabithorax Hox gene of *Drosophila* controls haltere size by regulating the Dpp pathway. *Development* **133**: 4495–4506.
- DESHPANDE, A., P. SICINSKI and P. W. HINDS, 2005 Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* **24**: 2909–2915.
- DIETZEL, S., H. NIEMANN, B. BRUCKNER, C. MAURANGE and R. PARO, 1999 The nuclear distribution of Polycomb during *Drosophila melanogaster* development shown with a GFP fusion protein. *Chromosoma* **108**: 83–94.
- FANG, J., T. CHEN, B. CHADWICK, E. LI and Y. ZHANG, 2004 Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J. Biol. Chem.* **279**: 52812–52815.
- FERRES-MARCO, D., I. GUTIERREZ-GARCIA, D. M. VALLEJO, J. BOLIVAR, F. J. GUTIERREZ-AVINO *et al.*, 2006 Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* **439**: 430–436.
- FICZ, G., R. HEINTZMANN and D. J. ARNDT-JOVIN, 2005 Polycomb group protein complexes exchange rapidly in living *Drosophila*. *Development* **132**: 3963–3976.
- FOLEY, K. P., M. W. LEONARD and J. D. ENGEL, 1993 Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet.* **9**: 380–385.
- FRIEDMAN, A., and N. PERRIMON, 2007 Genetic screening for signal transduction in the era of network biology. *Cell* **128**: 225–231.
- GARCIA, E., C. MARCOS-GUTIERREZ, M. DEL MAR LORENTE, J. C. MORENO and M. VIDAL, 1999 RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *EMBO J.* **18**: 3404–3418.
- GARCIA-BELLIDO, A., F. CORTES and M. MILAN, 1994 Cell interactions in the control of size in *Drosophila* wings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10222–10226.
- GATTI, M., and B. S. BAKER, 1989 Genes controlling essential cell-cycle functions in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **3**: 438–453.
- GEARHART, M. D., C. M. CORCORAN, J. A. WAMSTAD and V. J. BARDWELL, 2006 Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 6880–6889.
- GLICKSMAN, M. A., and D. L. BROWER, 1988 Expression of the Sex combs reduced protein in *Drosophila* larvae. *Dev. Biol.* **127**: 113–118.
- GORFINKIEL, N., L. FANTI, T. MELGAR, E. GARCIA, S. PIMPINELLI *et al.*, 2004 The *Drosophila* Polycomb group gene Sex combs extra encodes the ortholog of mammalian Ring1 proteins. *Mech. Dev.* **121**: 449–462.
- GRIMAUD, C., F. BANTIGNIES, M. PAL-BHADRA, P. GHANA, U. BHADRA *et al.*, 2006a RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell* **124**: 957–971.
- GRIMAUD, C., N. NEGRE and G. CAVALLI, 2006b From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res.* **14**: 363–375.
- JÜRGENS, G., 1985 A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *drosophila*. *Nature* **316**: 153–155.
- KIERNAN, J. A., 2001 Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes. *Biotech. Histochem.* **76**: 261–279.
- KLYMENKO, T., B. PAPP, W. FISCHLE, T. KOCHER, M. SCHEIDER *et al.*, 2006 A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev.* **20**: 1110–1122.
- KNOBLICH, J. A., and C. F. LEHNER, 1993 Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *EMBO J.* **12**: 65–74.
- KODJABACHIAN, L., M. DELAAGE, C. MAUREL, R. MIASSOD, B. JACQ *et al.*, 1998 Mutations in ccf, a novel *Drosophila* gene encoding a chromosomal factor, affect progression through mitosis and interact with Pc-G mutations. *EMBO J.* **17**: 1063–1075.
- KUZMICHEV, A., K. NISHIOKA, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST and D. REINBERG, 2002 Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* **16**: 2893–2905.
- LEE, T., and L. LUO, 1999 Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**: 451–461.
- LEWIS, E. B., 1978 A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565–570.
- LINDSLEY, D., and G. ZIMM, 1992 *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York.
- MACIAS, A., J. CASANOVA and G. MORATA, 1990 Expression and regulation of the abd-A gene of *Drosophila*. *Development* **110**: 1197–1207.
- MARTIN, E. C., and P. N. ADLER, 1993 The Polycomb group gene Posterior Sex Combs encodes a chromosomal protein. *Development* **117**: 641–655.
- MARTINEZ, A. M., and G. CAVALLI, 2006 The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* **5**: 1189–1197.
- MARTINEZ, A. M., S. COLOMB, J. DEJARDIN, F. BANTIGNIES and G. CAVALLI, 2006 Polycomb group-dependent Cyclin A repression in *Drosophila*. *Genes Dev.* **20**: 501–513.
- MEYER, H. H., J. G. SHORTER, J. SEEMANN, D. PAPPIN and G. WARREN, 2000 A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J.* **19**: 2181–2192.
- MEYER, H. H., Y. WANG and G. WARREN, 2002 Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J.* **21**: 5645–5652.
- MONTGOMERY, M. K., 2004 The use of double-stranded RNA to knock down specific gene activity. *Methods Mol. Biol.* **260**: 129–144.
- MOTZNY, C. K., and R. HOLMGREN, 1995 The *Drosophila* cubitus interruptus protein and its role in the wingless and hedgehog signal transduction pathways. *Mech. Dev.* **52**: 137–150.
- MULLER, J., C. M. HART, N. J. FRANCIS, M. L. VARGAS, A. SENGUPTA *et al.*, 2002 Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**: 197–208.
- NAGEL, A. C., D. MAIER and A. PREISS, 2002 Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* **212**: 93–98.
- NETTER, S., M. FAUCHEUX and L. THEODORE, 2001 Developmental dynamics of a polyhomeotic-EGFP fusion in vivo. *DNA Cell Biol.* **20**: 483–492.
- O'DOR, E., S. A. BECK and H. W. BROCK, 2006 Polycomb group mutants exhibit mitotic defects in syncytial cell cycles of *Drosophila* embryos. *Dev. Biol.* **290**: 312–322.
- ORR-WEAVER, T. L., 1994 Developmental modification of the *Drosophila* cell cycle. *Trends Genet.* **10**: 321–327.
- OTTE, A. P., and T. H. KWAKS, 2003 Gene repression by Polycomb group protein complexes: A distinct complex for every occasion? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**: 448–454.
- PATEL, N. H., E. MARTIN-BLANCO, K. G. COLEMAN, S. J. POOLE, M. C. ELLIS *et al.*, 1989 Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* **58**: 955–968.
- PATTATUCCI, A. M., and T. C. KAUFMAN, 1991 The homeotic gene Sex combs reduced of *Drosophila melanogaster* is differentially regulated in the embryonic and imaginal stages of development. *Genetics* **129**: 443–461.
- PETERSON, A. J., D. R. MALLIN, N. J. FRANCIS, C. S. KETEL, J. STAMM *et al.*, 2004 Requirement for sex comb on midleg protein inter-

- actions in *Drosophila* polycomb group repression. *Genetics* **167**: 1225–1239.
- PHILLIPS, M. D., and A. SHEARN, 1990 Mutations in polycombotic, a *Drosophila* polycomb-group gene, cause a wide range of maternal and zygotic phenotypes. *Genetics* **125**: 91–101.
- PIRITY, M. K., J. LOCKER and N. SCHREIBER-AGUS, 2005 Rybp/DEDAF is required for early postimplantation and for central nervous system development. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 7193–7202.
- REUTER, R., and M. P. SCOTT, 1990 Expression and function of the homoeotic genes Antennapedia and Sex combs reduced in the embryonic midgut of *Drosophila*. *Development* **109**: 289–303.
- RINGROSE, L., and R. PARO, 2004 Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 413–443.
- SANCHEZ, C., I. SANCHEZ, J. A. DEMMERS, P. RODRIGUEZ, J. STROUBOULIS *et al.*, 2007 Proteomics analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbxl10/Jhdm1B histone demethylase and the Bcl6 interacting corepressor. *Mol. Cell Proteomics* **6**: 820–834.
- SANCHEZ-HERRERO, E., 1991 Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in *Drosophila* embryos. *Development* **111**: 437–449.
- SANSON, B., P. WHITE and J. P. VINCENT, 1996 Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* **383**: 627–630.
- SATO, T., and R. E. DENELL, 1985 Homoeosis in *Drosophila*: anterior and posterior transformations of Polycomb lethal embryos. *Dev. Biol.* **110**: 53–64.
- SATO, T., and R. E. DENELL, 1987 Homoeosis in *Drosophila*: the lethal syndrome of the regulator of bithorax (or trithorax) locus and its interaction with other homoeotic loci. *Genetics* **116**: 389–398.
- SAURIN, A. J., C. SHIELS, J. WILLIAMSON, D. P. SATIJN, A. P. OTTE *et al.*, 1998 The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J. Cell Biol.* **142**: 887–898.
- SAWA, C., T. YOSHIKAWA, F. MATSUDA-SUZUKI, S. DELEHOUZEE, M. GOTO *et al.*, 2002 YEAF1/RYPB and YAF-2 are functionally distinct members of a cofactor family for the YY1 and E4TF1/hGABP transcription factors. *J. Biol. Chem.* **277**: 22484–22490.
- SCHLISIO, S., T. HALPERIN, M. VIDAL and J. R. NEVINS, 2002 Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function. *EMBO J.* **21**: 5775–5786.
- SCHUETTENGUBER, B., D. CHOURROUT, M. VERVOORT, B. LEBLANC and G. CAVALLI, 2007 Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* **128**: 735–745.
- SCHWARTZ, Y. B., and V. PIRROTTA, 2007 Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 9–22.
- SHAO, Z., F. RAIBLE, R. MOLLAAGHABABA, J. GUYON, C. WU *et al.*, 1999 Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* **9**: 37–46.
- SPARMANN, A., and M. VAN LOHUIZEN, 2006 Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 846–856.
- STELLING, J., U. SAUER, Z. SZALLASI, F. J. DOYLE, 3RD and J. DOYLE, 2004 Robustness of cellular functions. *Cell* **118**: 675–685.
- STRUHL, G., 1982 Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7380–7384.
- TRAM, U., B. RIGGS and W. SULLIVAN, 2001 *Cleavage and Gastrulation in Drosophila Embryos* (Encyclopedia of Life Sciences). Nature Publishing Group, London.
- TRIMARCHI, J. M., B. FAIRCHILD, J. WEN and J. A. LEES, 2001 The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 1519–1524.
- VALK-LINGBEEK, M. E., S. W. BRUGGEMAN and M. VAN LOHUIZEN, 2004 Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* **118**: 409–418.
- VAN DER LUGT, N. M., J. DOMEN, K. LINDERS, M. VAN ROON, E. ROBANUS-MAANDAG *et al.*, 1994 Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev.* **8**: 757–769.
- WANG, B., S. L. ALAM, H. H. MEYER, M. PAYNE, T. L. STEMMLER *et al.*, 2003 Structure and ubiquitin interactions of the conserved zinc finger domain of Npl4. *J. Biol. Chem.* **278**: 20225–20234.
- WANG, H., L. WANG, H. ERDJUMENT-BROMAGE, M. VIDAL, P. TEMPST *et al.*, 2004 Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**: 873–878.
- WHITE, R. A., and M. WILCOX, 1984 Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* **39**: 163–171.
- WODARZ, A., U. HINZ, M. ENGELBERT and E. KNUST, 1995 Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**: 67–76.

Communicating editor: K. G. GOLIC